Aus dem ChartéCentrum für Chirurgische Medizin
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und
Transplantationschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Neuhaus)

HABILITATIONSSCHRIFT

DIE BEDEUTUNG DER VASKULÄREN NUKLEOSID-TRIPHOSPHAT-DIPHOSPHOHYDROLASE (NTPDase 1/CD39) FÜR DEN HEPATISCHEN UND INTESTINALEN ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN IN DER MAUS

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Chirurgie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Olaf Guckelberger
geboren am 15. Juli 1967 in Berlin

eingereicht: März 2007
Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Holger Eltzschig
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Hopt

Für Anna Philine

0 INHALTSVERZEICHNIS

0.1 ABBILDUNGEN

0.2 TABELLEN

0.3 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

Abkürzung oder Symbol	*Definition*
5'-NT	5'-Nukleotidase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AOI	Area of Interest
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD39 oder CD73	Beschreibt das humane Protein
CD39	Beschreibt das humane Gen oder Gentranskript
cd39	Beschreibt das murine Protein
cd39 oder *cd73*	Beschreibt das murine Gen oder Gentranskript
$cd39^{-/-}$	*cd39*-null
$cd39^{+/-}$	*cd39*-heterozygot
$cd39^{+/+}$	*cd39*-Wildtyp
cGMP	Zyklisches Guaninmonophosphat
D-gal	2-Amino-2-Deoxy-D-Galaktose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
HUVEC	Humane aus Umbilikalvenen isolierte Endothelzellen
I_p	Perivaskuläre Lichtintensität

Abkürzung oder Symbol	*Definition*
I_v	Lichtintensität der Venole
IL-1α	Interleukin-1α
IL-6	Interleukin-6
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden
LPS	Lipopolysaccharid
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NTPDase	Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase
OD	Optische Dichte
P_i	Freies Phosphat
PFU	Plaque Forming Units
PMN	Neutrophile Granulozyten
rCD39Ad	Rekombinante CD39-kodierende Adenoviren
RNA	Ribonukleinsäure
Sham	Scheinoperierte Versuchstiere
SMA	Arteria mesenterica superior
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
UTP	Uridintriphosphat
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor
xCTX	Xenogene Herztransplantation
β-gal	β-Galaktosidase

1 EINLEITUNG

1.1 NUKLEOTIDE UND PURINERGE REZEPTOREN

1.1.1 Nukleotide

Die Bezeichnung Nukleotid geht auf die Erstbeschreibung des Nucleins (Nukleinsäure) im Jahre 1871 durch Friedrich Miescher im Zellkern von Eiterzellen (Leukozyten) zurück [Miescher, 1871]. 1929 identifizierte Phoebus Levene die Bausteine der Nukleinsäuren und bezeichnete die Einheit aus Purin- oder Pyrimidinbase, einer Pentose und einem Phosphatrest als Nukleotid (zitiert nach: [Dunn, 1991]). Die Verbindung aus einer solchen Base und einer Pentose wird Nukleosid genannt. Entsprechend der Anzahl an Phosphatresten wird für die Nukleotide die Bezeichnung Nukleosidmono-, Nukleosiddi- oder Nukleosidtriphosphat verwendet.

Die biologische Bedeutung der Nukleotide ergibt sich aus ihrer Beteiligung an einer Vielzahl intrazellulärer Funktionen. Als monomere Einheiten der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und der Ribonukleinsäure (RNA) kodieren sie die genetischen Informationen der Zelle und sind direkt oder indirekt an allen spezifischen Leistungen einer Zelle beteiligt. Die energiereichen Nukleotide, zumeist Adenosintriphosphat (ATP), sind zudem sowohl Endprodukte als auch Regulatoren vieler Reaktionen des Zellstoffwechsels. Entsprechend etablierte Daniel Atkinson 1968 das Konzept der Energieladung der Zelle, basierend auf den intrazellulären Konzentrationen der drei Adenosinphosphate (Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP) und ATP) [D. E. Atkinson, 1968]. Die zyklischen Monophosphate der Purinbasen (zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guaninmonosphosphat (cGMP)) hingegen konnten als intrazelluläre Mediatoren extrazelluärer, hormoneller Signale identifiziert werden („second messenger“).

Des weiteren haben Adenosinnukleotide eine Bedeutung als Komponenten gruppen- oder wasserstoffübertragender Koenzyme (Koenzym A, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mono-Nukleotid (FMN), Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD), Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADP)).

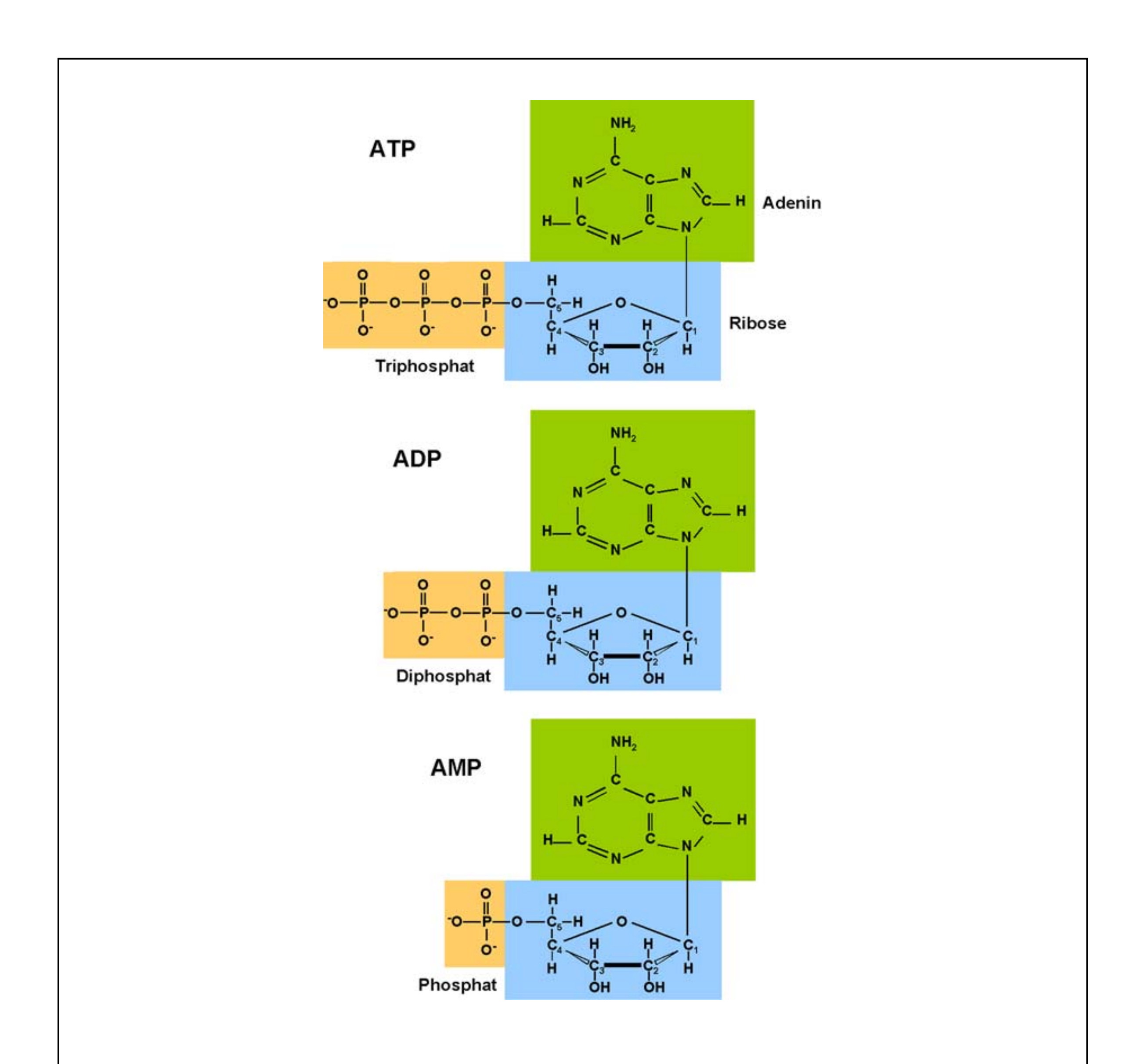


Abbildung 1: Chemische Struktur der Adenosinnukleotide. Die Purinbase Adenin (grün) bildet mit dem Monosaccharid Ribose (blau, Pentose) das Nukleosid Adenosin. Entsprechend der Anzahl der Phosphatreste (gelb) ergibt sich die Bezeichnung Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) oder Adenosinmonophosphat (AMP).

Physiologische Aktivitäten extrazellulärer Adeninderivate (Abbildung 1) wurden erstmals 1929 von Drury und Szent-Györgyi beschrieben [Drury,Szent-Györgyi, 1929]. Die experimentelle, intravenöse Injektion von ATP führte zu einem Abfall der Herzfrequenz und des arteriellen Blutdrucks. Im Jahre 1959 folgte als wesentlicher Schritt die Beschreibung des ATP als Neurotransmitter durch P. Holton [Holton, 1959]. Die Identifikation der verschiedenen Rezeptorklassen für Purinderivate (purinerge Rezeptoren) geht auf grundlegende Arbeiten von G. Burnstock im Jahre 1978 zurück [Burnstock, 1978]. In den neunziger Jahren konnte durch die Sequenzierung der verschiedenen purinergen Rezeptoren eine Funktion der extrazellulären Purine in einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse des Gefäß-, Immun- und Nervensystems nachgewiesen werden: Reizweiterleitung an Synapsen, Nozizeption, Regulation des Gefäßtonus, Regulation der Thrombozytenaggregation, Mastzelldegranulation, programmierter Zelltod (Apoptose) immunkompetenter Zellen (zusammengefasst in: [Brake,Julius, 1996]).

Als Mechanismen der Sekretion der Nukleotide in den Extrazellularraum wurden sowohl die Exozytose nukleotidreicher Granula, der Efflux durch Membrankanäle als auch die Aufnahme in den Golgi-Apparat und die Ausscheidung in Transportvesikeln gemeinsam mit Glykoproteinen beschrieben (Tabelle 1).

Zellulärer Mechanismus	Pathophysiologischer Kontext
Zelllyse	Zelltod (Nekrose)
Exozytose	Thrombozytenaggregation
	Neurotransmission
Plasmamembran-Permeabilität	Mechanische Stimulation
	Hypoxie
	Bakterielle Infektion
Vesikeltransport	Konstitutiv
	Mechanische Stimulation

Tabelle 1: Zelluläre Mechanismen und pathophysiologischer Kontext der Freisetzung von Nukleotiden in den Extrazellularraum (modifiziert nach: [Boeynaems et al., 2005]).

Außerdem werden hohe Nukleotidkonzentrationen im Rahmen von Zelllysen (Nekrose) freigesetzt [Boeynaems et al., 2005].

1.1.2 Purinerge Rezeptoren

Historisch erfolgte die Klassifikation der purinergen Rezeptoren in P1 und P2 entsprechend ihrer Agonisten [Stone, 1991]. Der physiologische Agonist der P1-Rezeptoren ist das Nukleosid Adenosin, während die P2-Rezeptoren vorwiegend von den Di- und Triphosphatnukleotiden des Adenosins stimuliert werden.

Entsprechend ihrer pharmakologischen Eigenschaften wurden die P1-Rezeptoren zunächst in die Subtypen A_1, A_{2A} und A_{2B} eingeteilt. Molekularbiologische Studien konnten die Existenz dieser drei Subtypen bestätigen und einen weiteren (A_3) identifizieren [Yaar et al., 2005]. Nach einer Empfehlung des Committee on Receptor Nomenclature and Classification der International Union of Pharmacology (NC-IUPHAR) sollte der Terminus P1-Rezeptor durch die Verwendung des Begriffes Adenosin-Rezeptor ersetzt werden [Fredholm et al., 2001]. Alle vier Adenosin-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte, transmembranöse Proteine, die zum Teil koexistent auf einer einzelnen Zelle exprimiert werden und gegensätzliche physiologische Antworten auslösen können. Die Aktivierung der einzelnen Adenosin-Rezeptor-Subtypen wird durch die Adenosinkonzentration beeinflusst [Daly,Padgett, 1992; Zhou et al., 1992; Peakman,Hill, 1994]. Durch Phosphorylierung der intrazellulären Schleifen kann eine Desensibilisierung der Rezeptoren eintreten [Palmer,Stiles, 1997]. Während die Subtypen A_{2A} und A_{2B} an die Adenylatzyklase der Zelle gekoppelt sind und ihre Stimulation die intrazelluläre Konzentration des cAMP erhöht, verringert die Aktivierung der A_1- und A_3-Rezeptoren das intrazelluläre cAMP und erhöht gleichzeitig die intrazelluläre Kalziumkonzentration über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) [Abbracchio et al., 1995; Fredholm et al., 2001]. Die aktuelle Nomenklatur der Adenosin-Rezeptoren und deren Beteiligung an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Rezeptor	**A_1**	**A_{2A}**	**A_{2B}**	**A_3**
Pathophysiologische Funktion	Bradykardie, Inhibition der Lypolyse, Reduktion der glomerulären Filtration, tuberoglomerulärer Feedback, Antinozizeption, Reduktion der sympathischen und parasympathischen Aktivität, präsynaptische Inhibition, neuronale Hyperpolarisation, ischämische Präkonditionierung	Regulation der sensomotorischen Integration in den Basalganglien, Inhibition der Thrombozyten-aggregation und der neutrophilen Granulozyten, Vasodilatation, Protektion vor Ischämieschäden, Stimulation der Aktivität sensorischer Nerven	Relaxation der glatten Muskulatur in Gefäßen und im Intestinum, Inhibition der Monozyten- und Makrophagen-funktion, Stimulation der Mastzell-degranulation	Verstärkung der Mastzell-degranulation, Präkonditionierung
Phänotyp	Pathophysiologische Funktionen in Knockout-Mäusen bestätigt	Pathophysiologische Funktionen in Knockout-Mäusen bestätigt		Pathophysiologische Funktionen in Knockout-Mäusen bestätigt

Tabelle 2: Überblick über die Nomenklatur und pathophysiologischen Funktionen der Adenosin-Rezeptoren (modifiziert nach: [Fredholm et al., 2001]).

Die P2-Rezeptoren werden aufgrund ihrer molekularen Struktur und dem Mechanismus der Signaltransduktion in zwei Familien, P2X und P2Y, unterteilt. Die Familie der ionotropen P2X-Rezeptoren sind kationenselektive, ligandengesteuerte Ionenkanäle („ligand gated ion channels") mit dem primären Agonisten ATP und sieben sequenzierten Subtypen ($P2X_1$ – $P2X_7$, Tabelle 3) [Boeynaems et al., 2005]. Alle P2X-Rezeptoren weisen eine geringe Selektivität für Natrium- (Na^+) gegenüber Kalium-Ionen (K^+) auf, die Permeabilität für

Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) hingegen unterscheidet sich erheblich zwischen den einzelnen Subtypen. Während $P2X_1$- und $P2X_3$-Rezeptoren unter kontinuierlicher ATP-Stimulation eine rasche Abnahme des Stromflusses zeigen, setzt die Desensibilisierung der $P2X_2$-, $P2X_4$- und $P2X_7$-Rezeptoren nur langsam ein. P2X-Rezeptoren treten als multimere Komplexe (Homo- oder Heteromere) auf und zeigen als Heteromere Eigenschaften, die sich aus der Kombination der einzelnen Subtypen ableiten. Aufgrund ihrer Expression in den verschiedenen Zellsystemen wurden P2X-Rezeptoren mit einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Funktionen in Verbindung gebracht. Das Fehlen stabiler und spezifischer Agonisten und Antagonisten erschwert die Untersuchungen in nativen biologischen Systemen jedoch erheblich. Studien in Knockout-Mäusen bestätigten die funktionelle Bedeutung der P2X-Rezeptoren vor allem bei der neurogenen Kontrolle der glatten Muskulatur, bei der Schmerz- und Viszeralperzeption und bei der Makrophagenfunktion [Khakh et al., 2001].

Subtyp	**Agonist**	**Phänotyp in Knockout-Mäusen**
$P2X_1$	ATP	Reduktion der Kontraktilität des Vas deferens, männliche Infertilität, Reduktion der neurogenen Vasokonstriktion, Reduktion der Autoregulation des renalen Blutflusses
$P2X_2$	ATP	Reduktion der ventilatorischen Antwort auf Hypoxie
$P2X_3$	ATP	Hyporeflexie der Harnblase, Reduktion der Schmerzantwort auf ATP und Formalin
$P2X_4$	ATP	unbekannt
$P2X_5$	ATP	unbekannt
$P2X_6$	ATP	unbekannt
$P2X_7$	ATP	Reduktion der ATP-induzierten antimykobakteriellen Aktivität und Zytokinfreisetzung in Makrophagen, Alterationen der Knochenformation und -resorption

Tabelle 3: Überblick über die Nomenklatur und pathophysiologischen Funktionen der P2X-Rezeptor-Familie (ATP: Adenosintriphosphat) (modifiziert nach: [Boeynaems et al., 2005]).

Die Familie der metabotropen P2Y-Rezeptoren besteht dagegen ebenfalls aus G-Protein-gekoppelten, transmembranösen Proteinen, von denen bisher acht humane Subtypen identifiziert wurden [Boeynaems et al., 2005]. Pharmakologische Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen der P2Y-Rezeptoren ergeben sich aus der Bindung an die verschiedenen G-Protein-Subtypen, der Aktivierung durch Purin- oder Pyrimidin-Nukleotide und der Aktivierung durch Nukleotiddi- oder Nukleotidtriphosphate (Tabelle 4) [Burnstock, 2006].

Gruppe	Subtyp	Agonist	G-Protein	Phänotyp in Knockout-Mäusen
A	$P2Y_1$	ADP	G_q	Inhibition der Thrombozytenaggregation, Verlängerung der Blutungszeit, keine Thromboembolie
	$P2Y_2$	ATP = UTP	G_q (+G_i)	Aufhebung der Chloridsekretion in den Atemwegen nach ATP/UTP
	$P2Y_4$	UTP	G_q (+G_i)	Aufhebung der Chloridsekretion in Jejunum und Kolon nach ATP/UTP
	$P2Y_6$	UDP	G_q	unbekannt
	$P2Y_{11}$	ATP	G_q +G_s	Kein $P2Y_{11}$-Gen in Mäusen vorhanden
B	$P2Y_{12}$	ADP	G_i	Inhibition der Thrombozytenaggregation, Verlängerung der Blutungszeit, keine Thromboembolie
	$P2Y_{13}$	ADP	G_i	unbekannt
	$P2Y_{14}$	UDP-Glukose	G_i	unbekannt

Tabelle 4: Überblick über die Nomenklatur und pathophysiologischen Funktionen der P2Y-Rezeptor-Familie. Die Pharmakologie der P2Y-Rezeptoren differiert in den verschiedenen Spezies, die angegebenen Agonisten beziehen sich auf die humanen Rezeptoren (ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, UTP: Uridintriphosphat, UDP: Uridindiphosphat) (modifiziert nach: [Boeynaems et al., 2005]).

Viele Zellen exprimieren mehrere P2Y-Subtypen. Die Stimulation rekombinanter P2Y-Rezeptoren aktiviert entweder die Phospholipase C und setzt intrazelluläres Kalzium frei oder beeinflusst die Aktivität der Adenylatzyklase und damit die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Die Kopplung einzelner P2Y-Subtypen an verschiedene G-Proteine und die Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Enzyme lässt ligandenspezifische Rezeptorkonformationen vermuten. Aus der Vielzahl der durch P2Y-Rezeptoren vermittelten Wirkungen der Nukleotide haben insbesondere die Stimulation der Thrombozytenaggregation ($P2Y_{12}$) und der Chloridsekretion der Epithelien ($P2Y_2$) klinische Bedeutung erlangt [Boeynaems et al., 2005].

1.2 EXTRAZELLULÄRER NUKLEOTID-STOFFWECHSEL

1.2.1 Ekto-Nukleotidasen

Interzelluläre Signalwege erfordern Mechanismen zur Inaktivierung der Stimulation und Wiederherstellung des Ruhezustandes. Neben der verminderten Sekretion von Signalmolekülen, der Rezeptordesensibilisierung (siehe auch 1.1.2) und der verminderten Expression von Rezeptoren, hat der extrazelluläre Abbau der Signalmoleküle eine entscheidende Bedeutung. Die extrazellulären Enzyme der Nukleotid-Nukleosid-Kaskade werden unter dem Begriff der Ekto-Nukleotidasen subsummiert und liefern als Endprodukte der Nukleotid-Hydrolyse das jeweilige Nukleosid und freies Phosphat (P_i). Als letzter Schritt folgt die rasche zelluläre Aufnahme der Nukleoside aus dem extrazellulären Raum durch spezifische membranständige Transportproteine (Nukleosid-Transporter) [Thorn,Jarvis, 1996; Noji et al., 2004].

Zu den bekannten Ekto-Nukleotidasen gehören die Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDase), Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (NPP), alkalischen Phosphatasen und die 5'-Nukleotidase (5'-NT), die ein nahezu ubiquitäres

Vorkommen zeigen [Zimmermann, 2000]. Die katalytisch aktiven Abschnitte der plasmamembranständigen Ekto-Nukleotidasen sind in den Extrazellularraum gerichtet und benötigen für eine maximale Aktivität divalente Kationen (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) oder eine alkalische Umgebung. Relevante Daten zur funktionellen Bedeutung der Ekto-Nukleotidasen für die purinergen Signalwege liegen derzeit vor allem für die NTPDasen und die 5'-NT vor [Zimmermann, 2001].

1.2.2 Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase (NTPDase)

Der Familie der NTPDasen gehören sechs Mitglieder an (NTPDase 1 bis NTPDase 6), die mit unterschiedlicher Präferenz verschiedene Nukleosid-Diphosphate oder -Triphosphate hydrolysieren und fünf über alle Mitglieder konservierte Aminosäuresequenzen enthalten („apyrase conserved regions“). Während die NTPDasen 1 bis 4 je zwei transmembranöse Domänen aufweisen, besitzen die NTPDasen 5 und 6 nur je eine solche Region und sind auch von der Membran abgespalten in löslicher Form nachweisbar [Zimmermann, 2001]. Lokalisiert sind die NTPDasen 1 bis 3 auf der Plasmazellmembran und hydrolysieren ATP und ADP mit erheblich variierender Aktivität (Abbildung 2). Die NTPDasen 4 bis 6 hingegen werden den Zellorganellen zugeordnet.

1.2.3 Ekto-5'-Nukleotidase (5'-NT)

Die 5'-Nukleotidase ist als Ekto-Enzym über eine Glykosylphosphadityl-Inositol-Brücke in der Zellmembran verankert, jedoch auch in abgespaltener, löslicher Form nachweisbar und zeigt eine weite Verbreitung in den Geweben [Zimmermann, 2000]. Somit ist die 5'-NT das gewichtigste Enzym für die Katalyse des letzten Schrittes des extrazellulären Nukleotid-Metabolismus, die Hydrolyse der Nukleosid-Monophosphate (NMP $\rightarrow$ Nukleosid + P_i) [Zimmermann, 2001], mit einer hohen Affinität für AMP [Hunsucker et al., 2005]. Extrazelluläre Nukleoside werden rasch über Nukleosid-Transporter-Proteine in den Intrazellularraum aufgenommen und dort weiter metabolisiert [Noji et al., 2004].

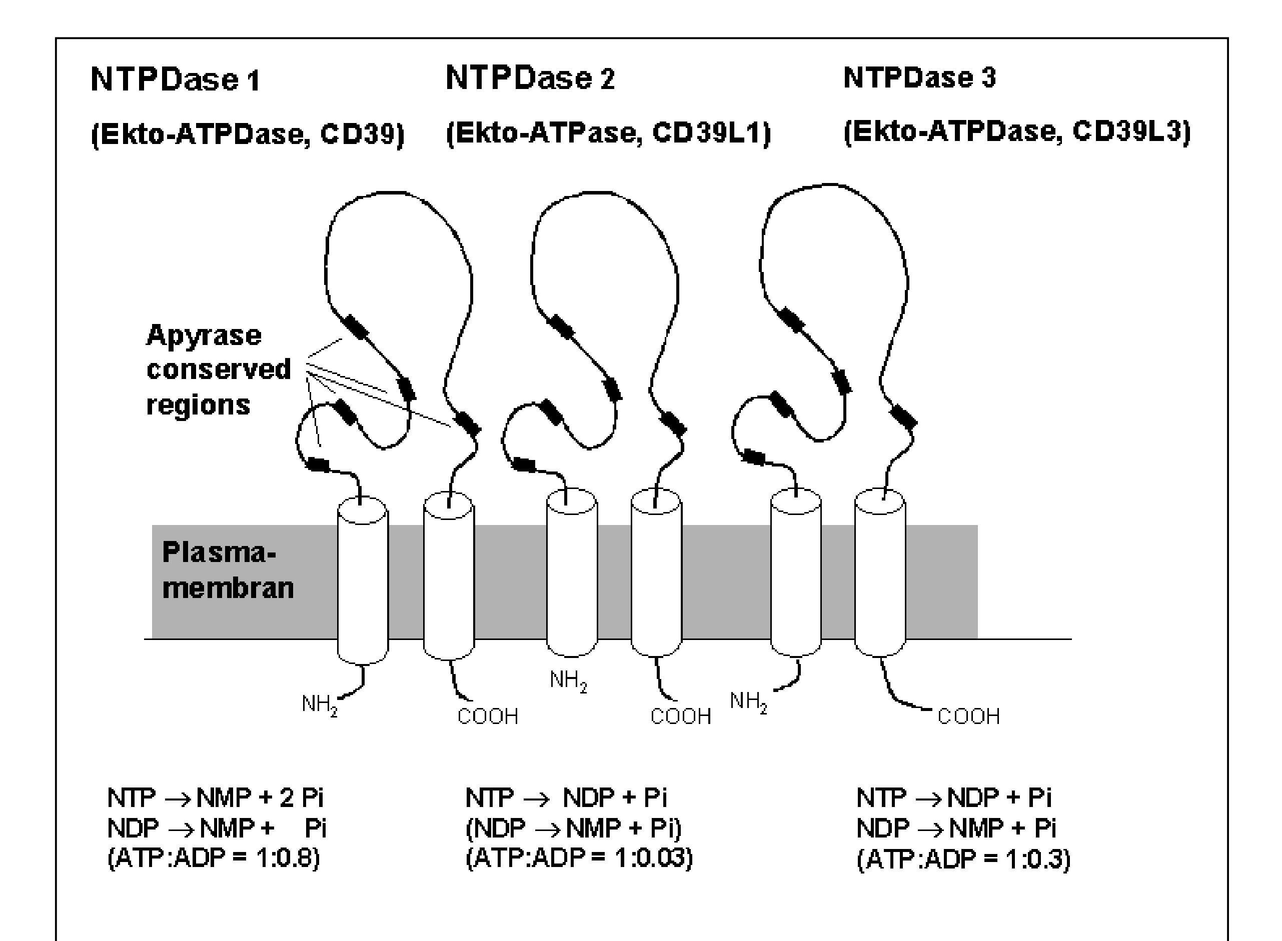


Abbildung 2: Familie der plasmamembranständigen Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDase). In Klammern sind die alternativen Bezeichnungen für die NTPDasen 1 bis 3 angegeben. Alle drei NTPDasen weisen je zwei transmembranöse Regionen und fünf „apyrase conserved regions" auf. Sowohl die Hydrolyse-Aktivität für die verschiedenen Substrate als auch die katalysierten Reaktionen variieren und sind im unteren Teil der Grafik wiedergegeben (NTP: Nukleosidtriphosphat, NDP: Nukleosiddiphosphat, NMP: Nukleosidmonophosphat, Pi: freies Phosphat, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosinmonophosphat) (modifiziert nach: [Zimmermann, 2000]) .

1.2.4 Vaskuläre Ekto-Nukleotidasen

CD39 wurde ursprünglich als Aktivierungsmarker von Natural-Killer-Zellen, B-Zellen und Subpopulationen von T-Zellen beschrieben [Kansas et al., 1991]. In den folgenden Jahren konnte eine Sequenzhomologie zur vaskulären Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase nachgewiesen und CD39 (NTPDase 1) als die dominante Ekto-Nukleotidase des Endotheliums etabliert werden, die intravaskuläres ATP und ADP zu AMP hydrolisiert [Robson et al., 2005]. Der folgende Stoffwechselschritt, die Konversion von AMP zu Adenosin (Abbildung 3), wird im Gefäßsystem überwiegend durch die 5'-NT katalysiert [Deussen et al., 1993], die bereits früher als Differenzierungsmarker (CD73) von B- und T-Lymphozyten beschrieben wurde [Thomson et al., 1990].

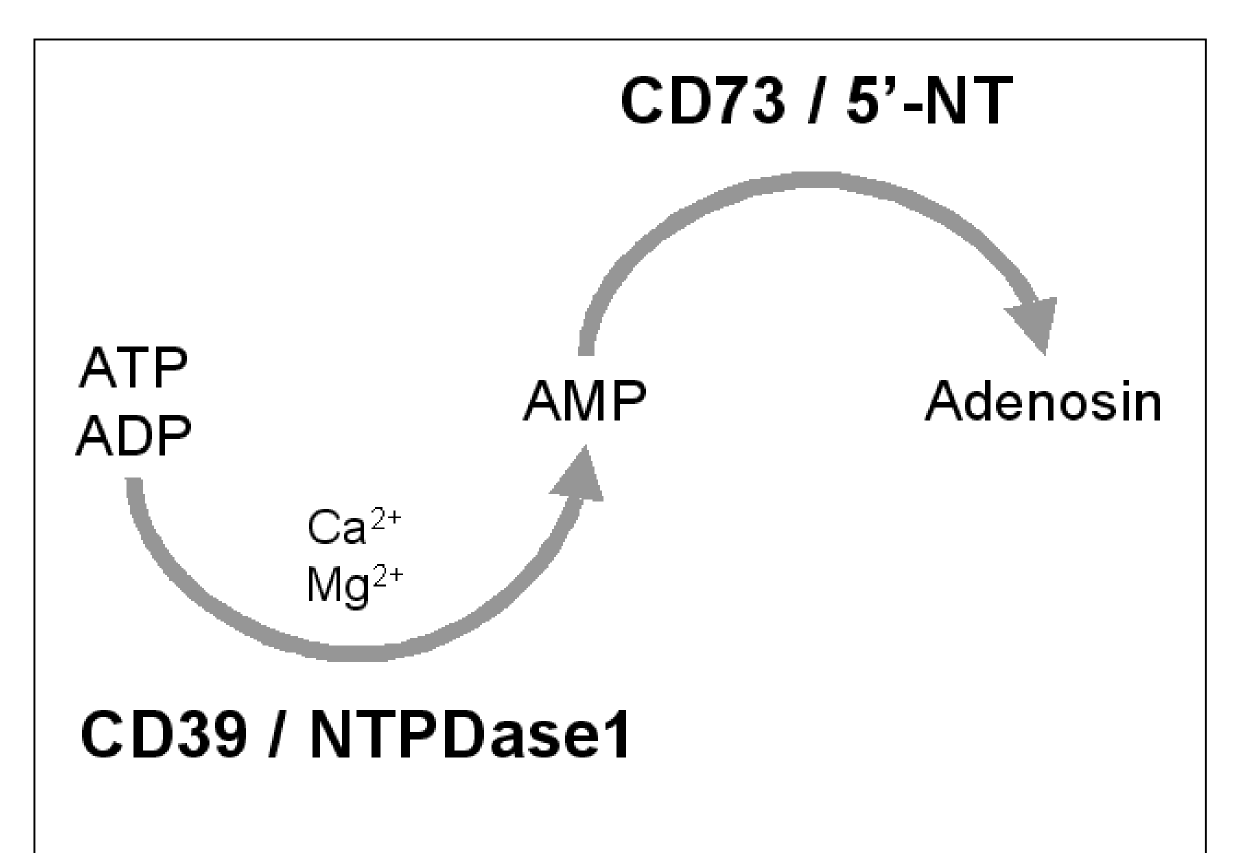


Abbildung 3: Vaskuläre Ekto-Nukleotidasen. Die Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 1 (CD39 / NTPDase 1) hydrolysiert kalzium- und magnesiumabhängig intravasales Adenosintriphosphat (ATP) und –diphosphat (ADP). Die Konversion des entstandenen Adenosinmonophosphat (AMP) wird durch die 5'-Nukleotidase (CD73 / 5'-NT) katalysiert.

1.3 CD39-AKTIVITÄT UND THROMBOGENESE

1.3.1 Physiologische Thromboregulation

Das ruhende Endothel bildet die antithrombotische Oberfläche des Gefäßsystemes. Zur Regulation der Thrombozyten-Aktivität und Aufrechterhaltung des Blutflusses im Gefäßsystem wurden drei Mechanismen beschrieben [Marcus et al., 2005]. Während Eikosanoide (Prostazyklin und Thromboxan) Zell-Zell-Interaktionen modulieren und Stickstoffmonoxid (NO) die intrazelluläre cGMP-Konzentration in Thrombozyten und Endothelzellen reguliert, metabolisiert die vaskuläre NTPDase 1 (CD39) prothrombotisches ADP.

ADP wurde bereits im Jahre 1961 als Agonist der Thrombozytenaggregation identifiziert [Gaarder et al., 1961]. Es wirkt synergistisch mit anderen Agonisten [Kinlough-Rathbone,Mustard, 1986; Ware et al., 1987] und stabilisiert reversible Thrombozytenaggregate [Cattaneo et al., 1990; Trumel et al., 1999]. Als Quelle des intravaskulären ADP wurden Makrophagen, Endothelzellen unter mechanischem oder oxidativem Stress und aktivierte Thrombozyten (Exozytose der elektronendichten Granula) beschrieben [Robson et al., 2005]. Die thrombogene Wirkung des ADP wird über die $P2Y_1$- und $P2Y_{12}$-Rezeptoren der Thrombozyten vermittelt und die Stimulation des $P2X_1$-Rezeptors durch freigesetztes ATP zeigt eine synergistische Wirkung [Packham,Mustard, 2005]. CD39 hydrolysiert freies intravasales ATP und ADP und kontrolliert somit die Konzentration dieser Nukleotide in der Mikroumgebung der endothelialen Oberfläche [Zimmermann, 1999]. Während Eikosanoide und NO im Ruhezustand der Gewebe nicht in den Extrazellularraum abgegeben werden, ist CD39 eine konstitutive Komponente der Endothelzellmembran und hält den Blutfluss unabhängig von den beiden anderen Systemen aufrecht [Marcus et al., 2005]. Der sequentielle Metabolismus des entstandenen AMP durch die 5'-NT (CD73) generiert zusätzlich antiaggregatorisch wirkendes Adenosin (A_{2A}-Rezeptor, Abbildung 4) [Zimmermann, 1999; Fredholm et al., 2001].

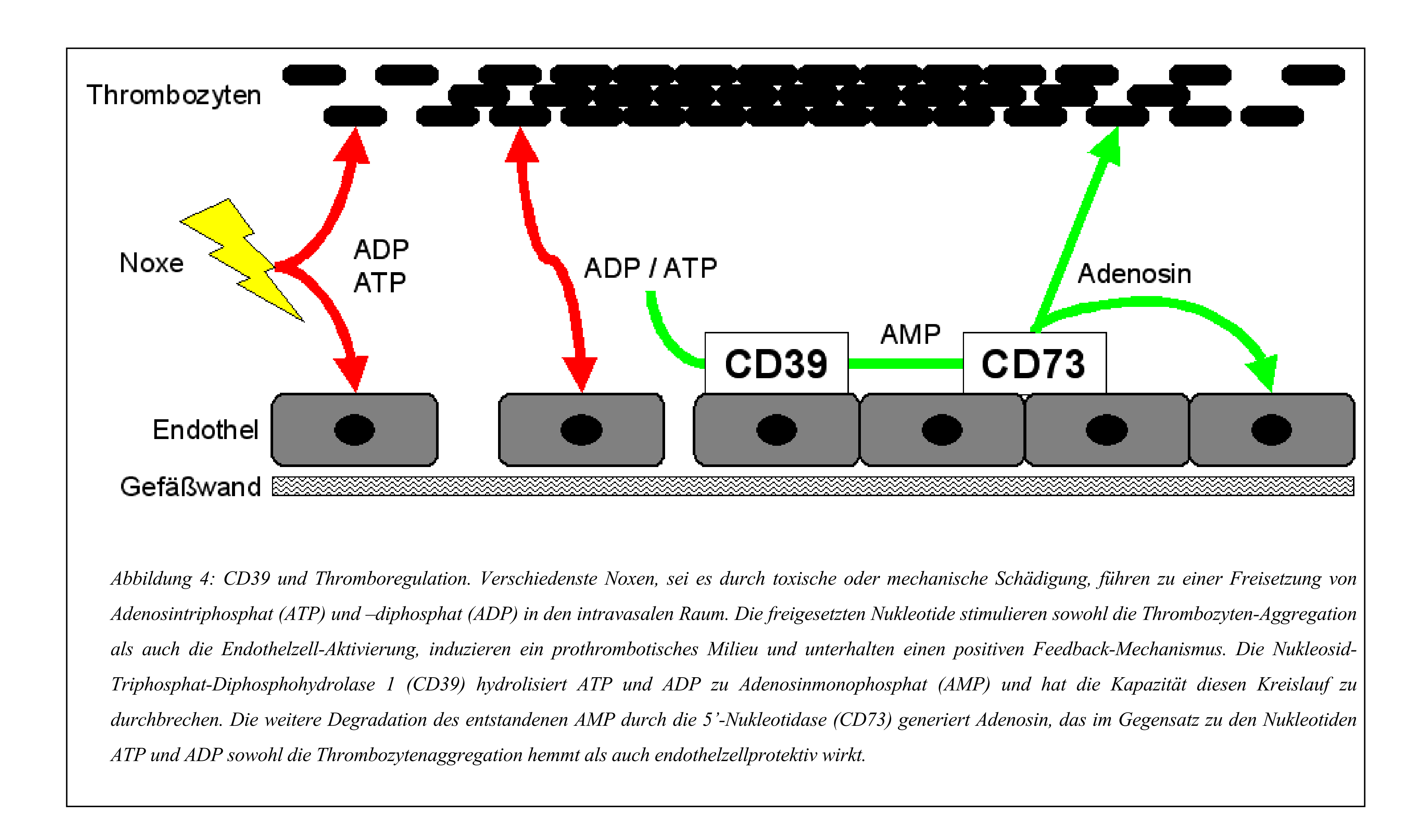


Abbildung 4: CD39 und Thromboregulation. Verschiedenste Noxen, sei es durch toxische oder mechanische Schädigung, führen zu einer Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP) und –diphosphat (ADP) in den intravasalen Raum. Die freigesetzten Nukleotide stimulieren sowohl die Thrombozyten-Aggregation als auch die Endothelzell-Aktivierung, induzieren ein prothrombotisches Milieu und unterhalten einen positiven Feedback-Mechanismus. Die Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 1 (CD39) hydrolisiert ATP und ADP zu Adenosinmonophosphat (AMP) und hat die Kapazität diesen Kreislauf zu durchbrechen. Die weitere Degradation des entstandenen AMP durch die 5'-Nukleotidase (CD73) generiert Adenosin, das im Gegensatz zu den Nukleotiden ATP und ADP sowohl die Thrombozytenaggregation hemmt als auch endothelzellprotektiv wirkt.

1.3.2 Ischämie und Reperfusion

Die Transplantation solider Organe ist obligat mit kalter und warmer Ischämie verbunden, die von der Reperfusionsphase des Transplantates gefolgt wird. Die Re-Exposition des Endothels gegenüber dem zirkulierenden Blut induziert im Transplantat eine akute Entzündungsreaktion [Serracino-Inglott et al., 2001]. Als Charakteristika dieses Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI) wurden die Formation von Mikrothromben und die Bildung von Aggregaten zirkulierender Blutzellen in Kapillaren oder hepatischen Sinusoiden, gefolgt von der Gewebeinfiltration mit Leukozyten, beschrieben [Cywes et al., 1993; Pinsky et al., 1995; Lentsch et al., 2000; Serracino-Inglott et al., 2001]. Eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung des IRI wird der Endothelzell-Aktivierung durch oxidativen Stress zugeschrieben [Lefer,Lefer, 1993].

Neben der Expression von Selektinen und Integrinen mit konsekutiver Adhäsion und Migration von neutrophilen Granulozyten [Milazzo et al., 1996; Thiagarajan et al., 1997], zeigt sich mit der Aktivierung der Endothelzellen ein Verlust ihrer gerinnungshemmenden Eigenschaften [Moore et al., 1989; Platt et al., 1990]. Die Antikoagulantien Heparansulfat und Thrombomodulin werden von der Endothelzellmembran eliminiert. Zusätzlich konnte sowohl nach Aktivierung kultivierter Endothelzellen (EC) durch Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) als auch nach renaler Ischämie und Reperfusion experimentell ein signifikanter Verlust der NTPDase-Aktivität nachgewiesen werden [Candinas et al., 1996; Robson et al., 1997]. Entsprechend geht die Fähigkeit CD39-transfizierter COS-7-Zellen zur Hemmung der Thrombozyten-Aggregation nach Stimulation mit ADP, Kollagen oder Thrombin durch oxidativen Stress verloren [Kaczmarek et al., 1996]. Es entsteht eine prokoagulatorische Oberfläche mit der Ausbildung von Mikrothromben, die als relevanter Trigger für die Genese der postischämen Entzündungsreaktion angesehen werden [Massberg et al., 1998; Massberg et al., 1999; Salter et al., 2001].

1.3.3 Organtransplantation

Ischämie, Reperfusion und Konservierung eines Organtransplantates traumatisieren zunächst das vaskuläre Endothel und gehen sekundär sowohl mit initialen Funktionsstörungen als auch vermehrten akuten und chronischen Abstoßungsepisoden oder chronischen Vaskulopathien einher [Lu et al., 1999; Robson et al., 2005]. Besonders eindrücklich und experimentell reproduzierbar manifestieren sich diese Sequenzen in den verschiedenen xenogenen Transplantations- und Abstoßungsmodellen, deren universelles histologisches Charakteristikum neben der Entzündungsreaktion die Ausbildung von Thrombosen darstellt [Robson et al., 1999; Soares et al., 1999].

Sowohl im xenogenen Herztransplantationsmodell der antikörpervermittelten hyperakuten Abstoßung als auch im komplementdepletierten Modell der verzögerten xenogenen Abstoßung konnte die intravenöse Administration einer wasserlöslichen NTPDase das Überleben der Xenotransplantate signifikant verbessern [Koyamada et al., 1996]. Das Serum der mit Apyrase, eine aus der Kartoffel isolierte wasserlösliche NTPDase, behandelten Tiere verhinderte in vitro zuverlässig die Thrombozytenaggregation. In den histologischen Präparaten zeigte sich entsprechend eine signifikante Verminderung der Thrombozytenaggregation und –aktivierung. Nach Infektion von xenogenen Spenderherzen mit rekombinanten, CD39-kodierenden Adenoviren im Modell der verzögerten Abstoßung war das Transplantatüberleben ebenfalls signifikant verlängert [Imai et al., 2000b]. 48 Stunden nach heterotoper Transplantation ließ sich ein Anstieg der NTPDase-Aktivität in den transplantierten Herzen nachweisen. Während die Kontrolltiere zu diesem Zeitpunkt in der Histologie erhebliche vaskuläre Thrombosen demonstrierten, zeigten die behandelten Herzen lediglich geringe Störungen der Myokardstruktur. Gleichartige histologische Befunde finden sich 24 Stunden nach Injektion von Antikörpern in einem Modell der antikörpervermittelten Abstoßung [Dwyer et al., 2004]. Humanes CD39 exprimierende Herzen transgener Spendertiere überlebten die Antikörpergabe im Median um drei Tage bis zur zellvermittelten Allograftabstoßung, während die Wildtyp-Organe innerhalb von 24 Stunden hyperakut abgestoßen wurden.

Spenderorgane von *cd39*-null Mäusen hingegen zeigten im verzögerten Abstoßungsmodell signifikant verkürzte Überlebenszeiten im Vergleich zu den Kontrollen [Enjyoji et al., 1999]. Neben ausgedehnten Infarktarealen und Einblutungen fanden sich in den transplantierten *cd39*-null Herzen deutlich ausgeprägte Fibrinablagerungen und eine vermehrte Expression von P-Selectin.

Die Wichtung des antithrombotischen oder eines generellen endothelzellprotektiven Effektes der aktiven vaskulären NTPDasen für das verlängerte Transplantatüberleben verbleibt zunächst unklar.

1.3.4 Endothelzell-Aktivierung

Von aktivierten Thrombozyten oder geschädigten Endothelzellen freigesetzte Nukleotide [Luthje, 1989] stimulieren nicht nur die Thrombogenese (siehe 1.3.1) sondern führen auch zu einer Aktivierung lokaler Endothelzellen [Motte et al., 1995] mit konsekutiver Sekretion gespeicherter (Typ-I-Aktivierung) [Cotran,Pober, 1989; Cotran,Pober, 1990; Vischer,Wollheim, 1998] oder *de novo* synthetisierter Proteine (Typ-II-Aktivierung) [Pober,Cotran, 1990; Bach et al., 1994].

Nach Inkubation mit CD39-Antisense-Nukleotiden führt die Aktivierung kultivierter Endothelzellen mit einem ADP-Stimulus zu einem prompten und mit den Kontrollen vergleichbaren Anstieg der ATP-Konzentration im Zellmedium [Imai et al., 1999b]. Der supprimierten CD39-Aktivität entsprechend, erfolgt die extrazelluläre Degradation des freigesetzten ATP jedoch deutlich verzögert. Somit moduliert CD39 das inflammatorische Milieu der Endothelzellen. Die Stimulation der Endothelzellen mit ATP selbst führt zu einer Typ-I-Aktivierung mit Freisetzung von von-Willebrand-Faktor [Goepfert et al., 2000]. Die Überexpression von CD39 durch einen rekombinanten adenoviralen Vektor limitiert diese Reaktion signifikant. In gleicher Weise werden die ATP-induzierte Typ-II-Aktivierung (E-Selectin-Expression), die Translokation des nukleären Faktors κB (NF-κB) in den Zellkern und die Apoptoseinduktion vermindert. Neben Nukleotiden führt auch die Aktivierung kultivierter Endothelzellen mit Lipopolysacchariden zu einer initialen Freisetzung von

intrazellulärem ATP, die von einer steigenden Interleukin-1α-Konzentration im Zellüberstand gefolgt wird [Imai et al., 2000a]. Die Infektion der Endothelzellen mit rekombinanten CD39-Adenoviren kupiert den sekundären ATP-Stimulus und führt zu einer deutlich verminderten Interleukin-1α-Sekretion. Eine vermehrte NTPDase-Aktivität schützt somit *in vitro* vor einer Typ-I- oder Typ-II-Aktivierung der Endothelzellen sowie einer Apoptose-Induktion.

1.4 *cd39*-NULL MÄUSE

Zum Studium der Bedeutung der vaskulären NTPDase für die Regulation der Hämostase und der Thrombogenese *in vivo* wurden *cd39*-null Mäuse generiert, die keine Entwicklungsauffälligkeiten und eine ungestörte Reproduktion zeigten [Enjyoji et al., 1999]. Isolierte und kultivierte kardiale Endothelzellen dieser Tiere weisen eine signifikant verminderte NTPDase-Aktivität im Vergleich zu ihren Wildtyp-Kontrollen auf und inhibieren die durch ADP induzierte Thrombozytenaggregation nur unvollständig. Die Plasmakonzentrationen von ATP, ADP und Adenosin unterscheiden sich nicht von den entsprechenden Werten in Wildtyp-Kontrollen. Entgegen dem Postulat eines prothrombotischen Phänotyps der *cd39*-null Mäuse findet sich jedoch eine signifikant verlängerte Blutungszeit bei einer nur geringgradig verminderter Thrombozytenzahl und einer ungestörten plasmatischen Gerinnung. Entsprechend zeigt sich *in vivo* eine substantielle Verzögerung der kapillären Thrombusformation nach Induktion eines vaskulären Schadens durch freie Radikale, bei unveränderter Plasmakonzentration von P-Selectin im Vergleich zu den Kontrollen. *In vitro* ist die Aggregation der isolierten Thrombozyten aus *cd39*-null Mäusen nach Stimulation mit ADP, Kollagen und Thrombin erheblich eingeschränkt. Ursächlich findet sich eine Desensibilisierung des $P2Y_1$-Rezeptors der *cd39*-null Thrombozyten, die sich durch Inkubation mit ATP bei Wildtyp-Kontrollen reproduzieren lässt. Die Inkubation mit Apyrase (wasserlösliche NTPDase) führt zu einer

Rekonstitution der Thrombozytenfunktion *in vitro* und *in vivo*. Auf eine prothrombotische Störung der Endothelzellfunktion in *cd39*-null Mäusen weisen vermehrte Fibrinablagerungen in den Organen und eine gesteigerte Aktivität des Tissue-Factors hin. Das Transplantatüberleben von *cd39*-null Spenderherzen in Wildtyp-Empfängern ist deutlich reduziert (siehe 1.3.3).

Zusammenfassend zeigen die generierten *cd39*-null Mäuse einen dualen Phänotyp mit einer Thrombozytendesensibilisierung und entsprechender Blutgerinnungsstörung bei einem gleichzeitigen prothrombotischen Zustand des Blutgefäßbettes der Organe.

1.5 HYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Die im Folgenden dargestellten und zu untersuchenden Hypothesen beschreiben die Bedeutung der vaskulären NTPDase-Aktivität für die Ausprägung eines Ischämie-Reperfusionsschadens (Abbildung 4):

1. Der Verlust der vaskulären NTPDase-Aktivität tritt in der frühen Phase der Organreperfusion auf.

2. Die intravasale NTPDase-Aktivität wirkt protektiv auf das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens, unabhängig von weiteren antiinflammatorischen Wirkungen im Rahmen der Organtransplantation.

3. Die NTPDase eliminiert den prothrombotischen und proinflammatorischen Stimulus der intravasalen Nukleotide ATP und ADP und stellt das Substrat für die Generierung des antithrombotischen und antiinflammatorischen Adenosin bereit.

4. Die Substitution der intravasalen NTPDase-Aktivität vermindert die postischäme Ausbildung von Mikrothromben und hat einen protektiven Einfluss auf die postischäme Endothelzell-Aktivierung.

Die folgenden Experimente zeigen zunächst den quantitativen Anteil der NTPDase 1/cd39 an der globalen NTPDase-Aktivität der verschiedenen Organe. Aus dem zeitlichen Verlauf der NTPDase-Aktivität in postischämen murinen Organen und nach xenogener Transplantation wird eine deletäre Wirkung des intravasalen NTPDase-Mangels in der frühen Reperfusionsphase postuliert und in hepatischen und intestinalen Ischämie-Reperfusions-Modellen überprüft. Für beide Organsysteme werden Strategien zur Kompensation des ischämiebedingten Verlustes der NTPDase-Aktivität entwickelt und in Überlebensexperimenten angewandt. Die Thrombozytenadhäsion in postkapillären, intestinalen Venolen und die Ausprägung des intestinalen Kapillarlecks zeigen die Auswirkungen *in vivo* an.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 TIERMODELLE

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Alle Tiere wurden in einer pathogenfreien, durch die American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care akkreditierten Einrichtung und in Übereinstimmung mit den Anforderungen an eine humane Tierhaltung entsprechend den Richtlinien des United States Department of Agriculture und des United States Department of Health and Human Services gehalten. Die Versuchstiere waren einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt, wurden mit kommerziell erhältlicher Tiernahrung versorgt und hatten freien Zugang zum Trinkwasser. Alle experimentellen Protokolle wurden durch das Beth Israel Deaconess Medical Center Animal Care and Use Program, Boston, USA genehmigt.

Wildtyp (C57BL/6x129Svj, *cd39*$^{+/+}$), *cd39*-null (*cd39*$^{-/-}$) und hemizygote (*cd39*$^{+/-}$) männliche Mäuse wurden in den Tierversuchseinrichtungen des Beth Israel Deaconess Medical Center gezüchtet. Weitere Kontrolltiere des selben genetischen Hintergrundes sowie BALB/c-Mäuse wurden von Taconic (Germantown, NY, USA) bezogen. Das Gewicht der Mäuse zum Versuchszeitpunkt betrug 17-25 g. Männliche Lewis-Ratten wurden von Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, USA) bezogen und wogen 250-300 g.

Die Anästhesie für die operativen Prozeduren erfolgte mittels Methoxyfluran Inhalation (Metofane, Mallinckrodt, Mundelain, IL, USA) oder im Falle einer prolongierten Narkose durch eine intraperitoneale Instillation von Pentobarbital (40-70 µg/g Körpergewicht, Nembutal, Abbott, North Chicago, IL, USA). Postoperativ wurde das Trinkwasser der Versuchstiere zur Analgesie mit Buprenorphin versetzt (0,01 mg/ml, Buprenex, Reckitt & Colman, Richmond, VA, USA).

2.1.2 Modell der intestinalen Ischämie

Vor der chirurgischen Intervention wurden die Mäuse einer nächtlichen Fastenperiode mit ungehindertem Trinkwasserzugang unterzogen. Über eine mediane Laparotomie wird die Arteria mesenterica superior (SMA) aufgesucht und an ihrem Ursprung aus der Aorta von dem umgebenden Gewebe isoliert. Die Induktion der intestinalen Ischämie erfolgt durch Okklusion der SMA mit einer atraumatischen mikrochirurgischen Gefäßklemme. Das Sistieren der Pulsation in der SMA wird mit dem stereoskopischen Zoommikroskop (SMZ-U, Nikon, Melville, NY, USA) überprüft und anschließend die Peritonealhöhle zur Vermeidung von Flüssigkeits- und Wärmeverlusten mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (4/0-Seide, Ethicon, Somerville, NJ, USA). Fünf Minuten vor Freigabe des Blutstromes in der SMA erfolgt die erneute Anästhesieeinleitung und die intravenöse Injektion der verschiedenen Testsubstanzen oder die Kanülierung der linken Nierenvene zur Infusion der Testsubstanzen. Tiere in Überlebensstudien erhalten vor dem zweischichtigen Bauchdeckenverschluss (4/0-Dermalon, Sherwood-Davis & Geck, St. Louis, MO, USA) eine intraperitoneale Instillation von 2 ml physiologischer Kochsalzlösung. Scheinoperationen erfolgen nach dem gleichen Muster, jedoch ohne Verschluss der Gefäßklemme.

2.1.3 Modell der hepatischen Ischämie

Die Induktion der hepatischen Ischämie in der Maus erfolgte nach einer Modifikation der von Surinder Yadav beschriebenen Technik [Yadav et al., 1998]. Nach einer medianen Laparotomie wird ein Retraktor in der Peritonealhöhle platziert, die untere Thoraxapertur über eine Klemme am Xyphoid angehoben und das Intestinum auf eine mit Kochsalzlösung getränkte Gaze ausgelagert und mit einer Plastikfolie abgedeckt. Nach Isolierung der Leberlappen erfolgt, jeweils so nah wie möglich am Eintritt des Gefäßpedikels in das Parenchym, die Ligatur (6/0-Seide, Ethicon) und Resektion des Lobus caudatus, des rechten lateralen Lobus sowie des Processus quadratus gemeinsam mit dem Processus papillaris (Abbildung 5a). Nach Verlagerung des Lobus medianus und des linken lateralen Lappens nach rechts wird nun zur Induktion der kompletten Leberischämie ein 2 mm breites

Gummiband um die Basis der verbliebenen Leberlappen geschlungen. Die Okklusion des rechten und linken Pedikels des Lobus medianus sowie des Pedikels des linken lateralen Leberlappens erfolgt nun durch Festziehen des Gummibandes (Abbildung 5b). Das Band wird durch eine atraumatische mikrochirurgische Gefäßklemme fixiert. In der Phase der Ischämie wird die Peritonealhöhle mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (4/0-Seide, Ethicon). Fünf Minuten vor der Freigabe der Leberperfusion erfolgen die erneute Anästhesieeinleitung und die intravenöse Injektion bzw. Kanülierung der linken Nierenvene wie oben beschrieben (siehe 2.1.2). Tiere in Überlebensstudien erhalten vor dem zweischichtigen Bauchdeckenverschluss (4/0-Dermalon, Sherwood-Davis & Geck) ebenfalls eine intraperitoneale Instillation von 2 ml physiologischer Kochsalzlösung.

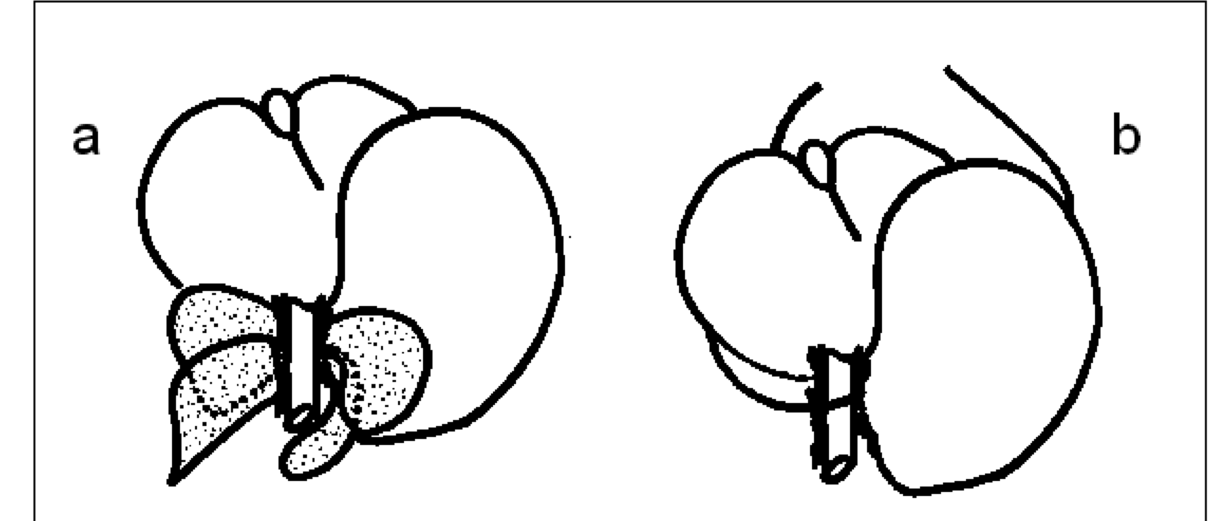


Abbildung 5: Modell der hepatischen Ischämie.

a) Nach der von Yadav beschriebenen Technik werden zunächst der Lobus caudatus, der rechte laterale Leberlappen und der Processus quadratus mit dem Processus papillaris ligiert und reseziert [Yadav et al., 1998].

b) Zur Induktion der Leberischämie werden die Pedikel der verbliebenen Leberlappen mit einem 2 mm breiten Gummiband umschlungen (linker lateraler Leberlappen sowie rechter und linker Pedikel des Lobus medianus).

2.1.4 Modell der heterotopen, xenogenen Herztransplantation

Die heterotope Transplantation der murinen Spenderherzen in die Empfängerratten erfolgte in einer modifizierten Technik nach Ono und Lindsey [Ono,Lindsey, 1969]. Nach der medianen Laparotomie und bilateralen Thorakotomie der Spendermaus werden zunächst der Aortenbogen und die Pulmonalarterie isoliert. Dann erfolgt die Kanülierung der Vena cava inferior und das Spenderherz wird mit eiskalter heparinisierter Kochsalzlösung perfundiert (4°C, 200 IU Heparin in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung). Im Anschluss erfolgen die Durchtrennung der Aorta direkt proximal der Arteria anonyma und der Arteria pulmonalis so weit distal wie möglich. Dann wird das Herz angehoben und eine Ligatur um beide Vorhöfe platziert (6/0-Seide, Ethicon). Es folgen die Durchtrennung der Vena cava und der Vena pulmonalis. Das Herz wird entnommen und für eine Stunde in eiskalter University-of-Wisconsin-Lösung (Viaspan, Barr Laboratories, Pomona, NY, USA) aufbewahrt. Es folgen die mediane Laparotomie der Empfängerratte und das Einbringen eines Retraktors. Das Intestinum wird in die rechte Hälfte der Peritonealhöhle verlagert und mit einer angewärmten, kochsalzgetränkten Gaze abgedeckt. Nach der Mobilisation der abdominellen Aorta und der Vena cava inferior erfolgt nun das Ausklemmen beider Gefäße mit einer Bulldog-Klemme. Die terminolateralen Anastomosen der Spenderaorta mit der Empfängeraorta und der Pulmonalarterie mit der Vena cava inferior werden in Einzelknopftechnik mit 8/0-Prolene (Ethicon) angelegt (Abbildung 6). Im Anschluss erfolgt die Freigabe des Blutstromes. Nach dem Eintritt einer vollständigen Hämostase und dem Einsetzen des Herzschlages wird der zweischichtige Bauchdeckenverschluss durchgeführt (4/0-Dermalon, Sherwood-Davis & Geck). Die Vitalität des Transplantates wird zweimal täglich durch Palpation überprüft.

Zum Erreichen einer Akkommodation [Bach et al., 1991] des konkordanten murinen Spenderherzens in der Ratte werden die Empfänger vor der Transplantation komplementdepletiert und postoperativ immunsuppressiv behandelt. Am Vortag der Transplantation und nach Beginn der Anästhesie erfolgt jeweils eine intraperitoneale Injektion von Cobra-Venom-Faktor (Tag –1: 60 U/kg Körpergewicht, Tag 0: 20 U/kg, Quidel, San Diego, CA, USA). Postoperativ werden täglich 15 mg/kg Körpergewicht Cyclosporin A intramuskulär injiziert (Novartis Pharma, Basel, Schweiz).

Im Rejektionsmodell der xenogenen Transplantation erhalten die Empfängertiere keine Vorbehandlung und im Verlauf keine Immunsuppression. Die Abstoßung der Wildtyp-Spenderherzen erfolgte zwischen 58 und 65 Stunden nach Transplantation im Rejektionsmodell, während das Akkommodationsmodell Überlebenszeiten von mehr als 45 Tagen zeigte [Imai et al., 1999c].

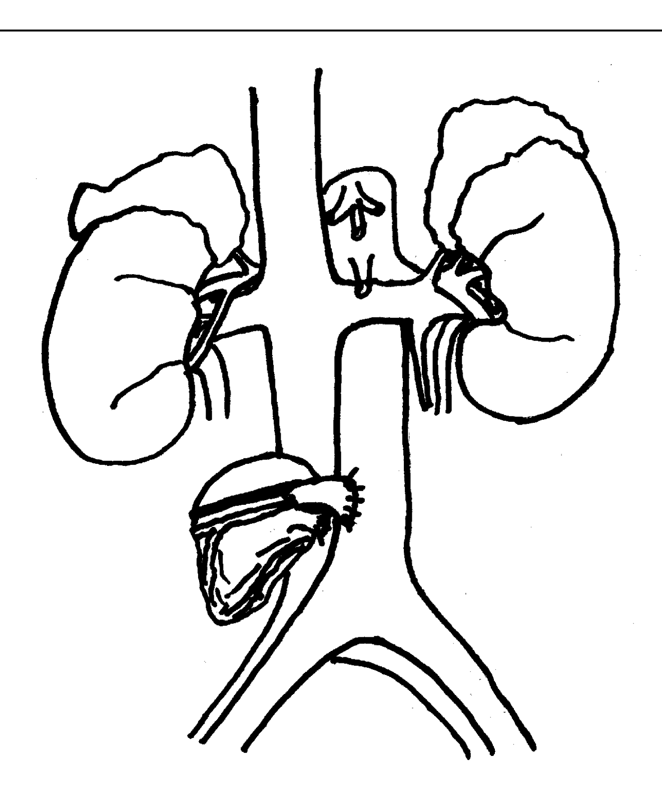


Abbildung 6: Modell der heterotopen, xenogenen Herztransplantation. Das Spenderherz (Maus) wird in das Abdomen des Empfängertieres (Ratte) transplantiert. Es erfolgt jeweils eine terminolaterale Anastomose zwischen der Pulmonalarterie des Spenders und der Vena cava inferior des Empfängers sowie zwischen dem Aortenbogen des Spenders und der Aorta abdominalis des Empfängers. Die Vorhöfe des Spenderorganes werden ligiert.

2.1.5 Modell der akuten toxischen Hepatitis

Zur Induktion der akuten toxischen Hepatitis wurden Wildtyp-Mäuse nach dem von C. Galanos beschriebenen Modell mit D-gal (2-Amino-2-Deoxy-D-Galaktose) sensibilisiert und mit einer geringen Dosis Lipopolysaccharid (LPS) behandelt [Galanos et al., 1979]. D-gal führt zu einem metabolischen Arrest der Hepatozyten und erhöht signifikant die Sensibilität der Mäuse für LPS. 20 mg D-gal (Sigma, St. Louis, MO, USA) und 0,5 µg *Salmonella abortus* equi LPS (Sigma) in 100 µl werden intraperitoneal injiziert. Die Überlebensraten in diesem Modell betrugen 91 % nach acht Stunden und 73 % nach 24 Stunden [Imai et al., 1999a].

2.2 BEHANDLUNGSGRUPPEN

2.2.1 NTPDase

Tiere, die der NTPDase-Behandlungsgruppe zugeordnet wurden, erhalten unmittelbar vor Freigabe des Blutstromes eine einmalige intravenöse Substitution mit wasserlöslicher NTPDase (0,2 U/g Körpergewicht, Stammlösung: 20 U/ml, Apyrase Grade VII, Sigma). Die Injektion erfolgt in die Penisvene der männlichen Versuchstiere. Die Kontrolltiere erhalten ein äquivalentes Volumen physiologischer Kochsalzlösung.

Ein Gruppe der *cd39*-null Mäuse erhält im Modell der intestinalen Ischämie zusätzlich achtstündlich intraperitoneale Apyrase-Injektionen (0,2 U/g Körpergewicht, bis 48 Stunden postoperativ).

2.2.2 Adenosin/Amrinon

Die Applikation von Adenosin erfolgt mittels einer kontinuierlichen Infusion und wird mit der Gabe von Amrinon, einem selektiven Phosphodiesterase-III-Inhibitor, kombiniert. Amrinon erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration und verstärkt die pharmakologischen Wirkungen von Adenosin [Kauffman et al., 1987]. Nach Kanülierung der Vena cava inferior oder der linken Nierenvene werden 1 µmol/kg/min Adenosin (Sigma) und 0,5 µmol/kg/min Amrinon (Sigma), fünf Minuten vor Reperfusion beginnend, über 60 Minuten kontinuierlich infundiert (Compact Infusion Pump Model 975, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Das gesamte Volumen der Infusion beträgt 0,576 ml. Während der Infusion wird die offene Peritonealhöhle mit einer angewärmten, kochsalzgetränkten Gaze bedeckt, um Wärme- und Flüssigkeitsverluste zu minimieren.

2.2.3 A20-Gentransfer

A20 ist ein antiapoptotisch wirksames Protein, dessen Expression Teil der physiologischen Antwort der Hepatozyten auf eine toxische Schädigung ist [Arvelo et al., 2002]. Entsprechend zeigten Mäuse, die mit einem rekombinanten A20-Adenovirus infiziert wurden, in einem Modell der akuten toxischen Hepatitis einen deutlichen Überlebensvorteil.

Fünf Tage vor der hepatischen Ischämie erfolgt bei einer Versuchsgruppe der *cd39*-null Mäuse der A20-Gentransfer über eine Injektion in die Penisvene ($1x10^9$ Plaque Forming Units (PFU) in 100 µl). Die A20-Adenoviren wurden freundlicherweise von C. Ferran (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Eine weitere Gruppe von Versuchstieren wurde mit Kontrollviren infiziert (β-Galaktosidase: β-gal), die freundlicherweise von R. Gerard (University of Texas South Western, TX, USA) zur Verfügung gestellt wurden.

2.3 ÜBERLEBENSSTUDIEN

In den Überlebensstudien wurden die operierten Tiere nach 60-minütiger intestinaler (siehe 2.1.2) oder 45-minütiger hepatischer (siehe 2.1.3) Ischämie für insgesamt sieben Tage nachbeobachtet. Die Ischämiezeiten orientierten sich an der in Pilotstudien bestimmten medianen Letalitätsdosis (LD50) für unbehandelte Wildtyp-Mäuse im intestinalen Ischämie-Reperfusions-Modell sowie für unbehandelte *cd39*$^{+/-}$-Mäuse im Modell der hepatischen Ischämie.

Die Überlebensraten wurden in folgenden Studiengruppen ermittelt:

1. 45 Minuten hepatische Ischämie in C57BL/6x129Svj-Mäusen
   (*cd39*$^{+/+}$, *cd39*$^{+/-}$, *cd39*$^{-/-}$, n=25 je Gruppe)

2. 45 Minuten hepatische Ischämie in *cd39*-heterozygoten C57BL/6x129Svj-Mäusen
   (lösliche NTPDase, Adenosin/Amrinon, n=6 je Gruppe)

3. 45 Minuten hepatische Ischämie in *cd39*-null C57BL/6x129Svj-Mäusen
   (A20-Gentransfer, n=5)

4. 60 Minuten intestinale Ischämie in Wildtyp-C57BL/6x129Svj-Mäusen
   (nativ, lösliche NTPDase, Adenosin/Amrinon, n=5 je Gruppe)

5. 60 Minuten intestinale Ischämie in *cd39*-heterozygoten C57BL/6x129Svj-Mäusen
   (nativ, lösliche NTPDase, n=5 je Gruppe)

6. 60 Minuten intestinale Ischämie in *cd39*-null C57BL/6x129Svj-Mäusen
   (nativ, lösliche NTPDase einfache und wiederholte Gabe, Adenosin/Amrinon,
   n=5 je Gruppe)

2.4 INTRAVITALE VIDEOMIKROSKOPIE

2.4.1 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

Die Fluoreszenzmarkierung der Spenderthrombozyten erfolgte nach der von C. Denis beschriebenen Methode [Denis et al., 1998]. Für jedes Versuchstier wurden Vollblutproben von zwei Wildtyp-Spendermäusen gesammelt und mit 10 Volumen-% Antikoagulanz versetzt (38 mM Citratsäure / 75 mM Trisodiumcitrat / 100 mM Dextrose). Die Präparation des thrombozytenreichen Plasmas erfolgte durch zwei subsequente Zentrifugenzyklen (280 x g) für sechs und vier Minuten. Gereinigte Thrombozyten wurden mittels einer PIPES-Puffer (25 mM Pipes / 137 mM NaCl / 4 mM KCl / 0,1 % Dextrose / pH 7,0) äquilibrierten Säulenfiltration (25 ml Trockenvolumen, Sepharose 2B, Sigma) erhalten. Die Thrombozytenkonzentrationen wurden mit einem automatisierten Partikelzähler bestimmt (Z1, Coulter, Miami, FL, USA) und auf eine endgültige Konzentration von $3x10^8$/ml verdünnt. Zur Markierung der gefilterten Thrombozyten erfolgte eine 15 minütige, lichtgeschützte Inkubation mit 1 µg/ml Calcein AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Vor Verwendung der markierten Thrombozyten erfolgte eine Kontrolle der Fluoreszenz. Alle Verarbeitungsschritte der Thrombozyten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach Induktion einer einstündigen intestinalen Ischämie erfolgt vor Reperfusion die intraperitoneale Instillation von Pentobarbital sowie die Injektion der fluoreszenzmarkierten Spenderthrombozyten ($5x10^6$ Thrombozyten pro g Körpergewicht in 200 bis 400 µl PIPES-Puffer) allein oder in Kombination mit den Testsubstanzen über die Penisvene. Sofort nach Freigabe des Blutstromes folgt die Lagerung des Versuchstieres auf eine selbstgebaute Mikroskophalterung und die Auslagerung und Fixierung einer proximalen Jejunumschlinge in der Spülkammer. Die exponierte Jejunumschlinge wird kontinuierlich mit angewärmter (37°C) Ringer-Lactat-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, USA) umspült. Anschließend erfolgt die Kontrolle der erfolgreichen Reperfusion mit der konventionellen Durchlichtmikroskopie.

Je 10 Segmente submuköser Arteriolen und Venolen werden zufällig ausgewählt und über 30 Sekunden mittels Epiillumination über ein 40x Wasserimmersionsobjektiv visualisiert. Das Mikroskop (Optiphot, Nikon, Melville, NY, USA) ist mit einer 100 Watt

Quecksilberlampe (HB-1010 AF, Nikon) und den passenden Exzitations-Emissions-Filtern bestückt. Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder erfolgt mittels einer CCD-Videokamera (CCD 72, Dage-MTI, Michigan City, IN, USA) mit einer Online-Wiedergabe auf einem 12-Zoll-Monitor (HR 120, Dage-MTI). Die Aufzeichung erfolgt im S-VHS-Format auf einem kommerziell erhältlichen Videorekorder (PV-S7670, Panasonic, Secaucus, NJ, USA). Die Auswertung wurde off-line unter Verwendung des beschriebenen analogen Videosystems oder nach Digitalisierung auf einem Macintosh Computer durchgeführt. Zur digitalen Bildanalyse wurde das unter einer Public Domain Lizenz erhältliche Programm NIH Image verwendet (entwickelt am U.S. National Institute of Health und verfügbar über das Internet unter http://rsb.info.nih.gov/nih-image/).

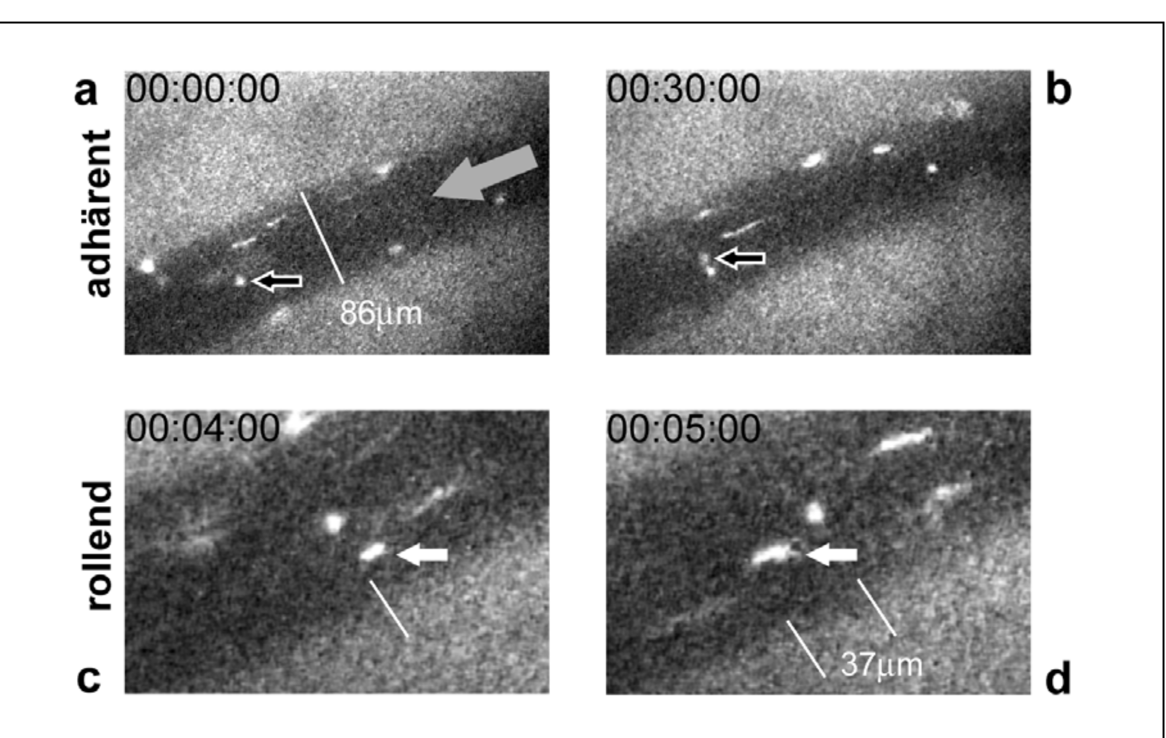


Abbildung 7: Adhärente und rollende Thrombozyten in der intravitalen Videomikroskopie. Die Abbildungen a bis d zeigen die gleiche jejunale Venole (Durchmesser 86 μm, weißer Balken in a) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (obere linke Ecke). Der Blutfluss ist von der oberen rechten Bildecke nach links unten gerichtet (grauer Pfeil). Obere Reihe: Ein adhärenter, fluoreszenzmarkierter Thrombozyt (offener Pfeil) verbleibt während der gesamten Beobachtungszeit von 30 s ortsständig an der Gefäßwand haften (a: Beginn der Beobachtungszeit, b: Ende der Beobachtungszeit). Untere Reihe (stärkere Vergrößerung): Ein rollender Thrombozyt bewegt sich mit deutlich reduzierter Geschwindigkeit entlang der Gefäßwand. Die Distanz beträgt 37 μm innerhalb von einer Sekunde (weißer Pfeil, c: 4. Sekunde, d: 5. Sekunde).

Die Klassifikation der Interaktionen der markierten Thrombozyten mit dem Endothel erfolgte nach der von S. Massberg angegebenen Definition als adhärent oder rollend [Massberg et al., 1998]. Adhärente Thrombozyten waren während der gesamten Beobachtungszeit stationär an der Gefäßwand angeheftet (Abbildung 7). Markierte Thrombozyten, die innerhalb von 30 Sekunden wenigstens einmal ihre Position veränderten, wurden als rollend klassifiziert, genauso wie Thrombozyten, die eine beliebige zum Blutstrom vertikale Ebene mit einer signifikant gegenüber dem zentralen Blutstrom verminderten Geschwindigkeit kreuzten. Unter der Annahme einer zylindrischen Geometrie des beobachteten Gefäßsegments erfolgte die Quantifizierung der adhärenten Thrombozyten als Anzahl der Zellen pro Quadratmillimeter endothelialer Oberfläche. Rollende Thrombozyten werden als Anzahl der Zellen pro Millimeter Gefäßdurchmesser und Sekunde angegeben.

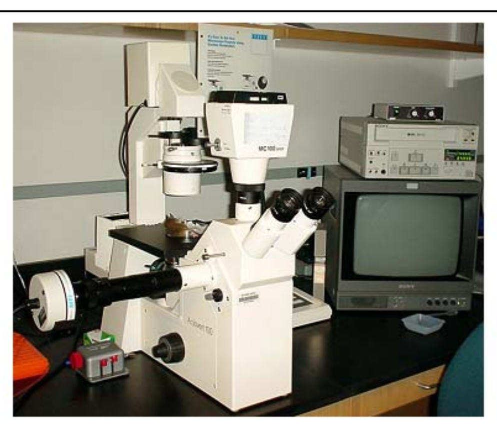
Untersucht wurden Wildtyp-Mäuse in der Reperfusionsphase nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior, die entweder mit physiologischer Kochsalzlösung oder löslicher NTPDase behandelt wurden (n=5 je Gruppe) sowie scheinoperierte Tiere (n=3).

2.4.2 Intestinales Kapillarleck

Nach Induktion einer 45-minütigen intestinalen Ischämie wurde bei allen Versuchstieren ein Infusionsport (Micro Implantable Infusion Port, Harvard Apparatus) implantiert und die rechte Jugularvene kanüliert. Vor der Freigabe des intestinalen Blutstromes erfolgt die Injektion fluoreszenzmarkierten Albumins über den Infusionsport (4 µl/g Körpergewicht einer 6,25 mg/ml phosphatgepufferten Kochsalzlösung, FITC-Albumin, Sigma) und die Spülung der Portkammer mit 120 µl physiologischer Kochsalzlösung. Sofort nach Reperfusion werden die Versuchstiere wiederum auf einer selbstgebauten Halterung gelagert und eine proximale Jejunumschlinge in der Spülkammer fixiert (Abbildung 8a). Unter konstanter Spülung mit angewärmter Ringer-Lactat-Lösung erfolgt die Auswahl der Area of Interest (AOI) mittels Durchlichtmikroskopie. Die gewählte AOI wird in der Folge innerhalb einer Stunde alle 10 Minuten für 10 Sekunden mittels Epiillumineszenz visualisiert. Das Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Thornwood, NY, USA) ist mit einem 40x-Objektiv, einer

100 Watt Quecksilberlampe (HBO100, Zeiss) und einem passenden Exzitations-Emissions-Filterset ausgestattet. Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder erfolgt über eine CCD-Videokamera mit manuellen Reglern für die Bildverstärkung und Schwarzanpassung (RC 300, Dage-MTI). Zur Aufzeichnung wird ein S-VHS Videosystem (SVO-9500 MD, Sony, San Jose, CA, USA) mit einer Online-Wiedergabe auf einem 13-Zoll-Monitor (PVM-137, Sony) verwendet (Abbildung 8b). Zu Beginn der ersten aufgezeichneten Sequenz erfolgt die manuelle Einstellung der Bildverstärkung und Schwarzanpassung, die für die restlichen Sequenzen des jeweiligen Experimentes unverändert beibehalten wird. Für die Auswertung wurden die Videosequenzen digitalisiert und ebenfalls mit dem NIH Image Programm analysiert. Der mittlere Anstieg der Lichtintensität über die Beobachtungszeit in einer perivaskulär gelegenen AOI (maximale Distanz zum Gefäß: 20 µm) wurde in Werten auf der Grauskala (arbiträre Einheit, 0-255) angegeben (I_P) und in Relation zur mittleren Lichtintensität in der benachbarten postkapillären Venole bewertet (I_V). Der Quotient I_P/I_V galt als Parameter für das kapilläre Albuminleck.

a



b

Abbildung 8: Intestinales Kapillarleck in der intravitalen Videomikroskopie. FITC-markiertes Albumin wurde intravenös injiziert und die narkotisierte Maus auf der selbstgebauten Halterung platziert (a). Das proximale Jejunum wurde ausgelagert und in der Spülkammer fixiert. In dem rechten Bild ist der Aufbau des Videomikroskops mit CCD-Videokamera, manuellem Verstärkungsregler, Videorekorder und Kontrollmonitor wiedergegeben (b, Hersteller und technische Details siehe Text).

Untersucht wurden Wildtyp- und *cd39*-null Mäuse in der Reperfusionsphase nach 45-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior (n=5 je Gruppe) sowie scheinoperierte Tiere (n=3).

2.5 INTESTINALE GEFÄßPERMEABILITÄT

Nach Induktion einer 45-minütigen intestinalen Ischämie und 10 Minuten vor der Freigabe des Blutstromes erfolgt die Injektion von 8 µl/g Körpergewicht einer 0,5%-igen Evans Blue Lösung (Sigma) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung über die Penisvene. Alle Testsubstanzen werden in diesem Versuchsaufbau, fünf Minuten vor Reperfusion beginnend, kontinuierlich über die rechte Iliacalvene appliziert. Unter Verwendung der Infusionspumpe wird ein konstantes Volumen von 0,576 ml innerhalb von 60 Minuten injiziert. Die Konzentrationen der Testsubstanzen wird dem Körpergewicht des Versuchstieres entsprechend variiert. Eine Stunde nach der Freigabe des Blutstromes erfolgt die Inzision der Portalvene und die arterielle Perfusion mit angewärmter physiologischer Kochsalzlösung über die linke Herzkammer, bis zum Erreichen eines klaren Ausstromes aus der Vena portae. Das Lumen des entnommenen Dünndarmes wird ebenfalls mit angewärmter Kochsalzlösung gespült (10 ml) und die jejunalen Proben anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Akkumulation des Evans Blue Farbstoffs in den Geweben (Abbildung 9) steht in enger Relation zum Albumintransport über die Endothelbarriere und wird deshalb als Parameter für die vaskuläre Permeabilität angesehen [Fry et al., 1977]. Die quantitative Bestimmung des Evans Blue Farbstoffs erfolgte nach der von G. W. Barone angegebenen Technik [Barone et al., 1989]. Das Gewicht der Jejunumproben (ca. 50 mg) wurde bestimmt und die Formamide-Extraktion (1,5 ml, Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA) für zwei Stunden bei 55°C durchgeführt. Die Lichtadsorption des Überstandes wurde in dreifacher Ausfertigung bei einer Wellenlänge von 610 nm gemessen und die Referenzadsorption bei 450 nm subtrahiert. Die Datenangabe erfolgt in arbiträren Einheiten der Lichtadsorption

(optische Dichte, OD) pro g Probengewicht.

Neben den ischämen und scheinoperierten Wildtyp- und *cd39*-null Versuchstieren in den Behandlungs- und Kontrollgruppen wurden zusätzliche Bestimmungen der basalen vaskulären intestinalen Permeabilität in nativen Tieren durchgeführt (n=3 je Gruppe). Ohne vorhergehende Eröffnung der Peritonealhöhle erfolgte die Injektion der Evans Blue Lösung und 60 Minuten später die Gewinnung der Gewebeproben wie oben beschrieben.

Abbildung 9: Intestinale Gefäßpermeabilität. Evans Blue Farbstoff wurde intravenös injiziert und die Akkumulation in jejunalen Gewebeproben als Parameter für die vaskuläre Permeabilität gemessen. Im Foto gezeigt ist die Verfärbung des Intestinums einer cd39-null Maus nach vorangegangener Scheinoperation.

2.6 SERUM- UND GEWEBEPROBEN

2.6.1 Probengewinnung

Die Gewinnung der Serum- und Gewebeproben erfolgte unmittelbar vor Freigabe des Blutstromes, zum angegebenen Zeitpunkt nach Reperfusion oder von nativen Tieren. Nach Einleitung der Anästhesie wurde die Peritonealhöhle eröffnet und eine vollständige Entnahme des zirkulierenden Blutes über die Vena cava inferior mit einer heparinisierten Spritze durchgeführt. Die zentrifugierten Serumproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C bis zur endgültigen Analyse aufbewahrt. Nach Entnahme der verschiedenen Gewebeproben erfolgte zunächst die Spülung mit angewärmter physiologischer Kochsalzlösung. Die Lumina von Hohlorganen wurden ebenfalls mit angewärmter Kochsalzlösung gespült. Zur Aufbewahrung bis zur Durchführung der unten beschriebenen Analysen wurden die Gewebeproben entweder in Formalin fixiert oder ebenfalls in flüssigem Stickstoff, teilweise unter Verwendung eines Gefriermediums (TBS, Master*Tech Scientific, Lodi, CA, USA), schockgefroren und bei –80°C gelagert.

2.6.2 Serumzytokine und -VEGF

Für die Bestimmung der Serumkonzentrationen des Interleukin-1α (IL-1α), Interleukin-6 (IL-6), TNF-α und des Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) bezogen. Die Durchführung der Experimente erfolgte entsprechend der Empfehlungen des Herstellers. Alle Proben wurden in dreifacher Ausfertigung gemessen.

Die Serumzytokine wurden in scheinoperierten Wildtyp-Mäusen sowie nach einer einstündigen Reperfusionsphase nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior bestimmt. Die postischämen Tiere wurden entweder mit löslicher NTPDase oder dem Vehikel behandelt (n=3 je Gruppe).

Die Bestimmung der VEGF-Konzentration erfolgte in nativen Wildtyp- und *cd39*-null Mäusen (n=3 je Gruppe).

2.6.3 Myeloperoxidase-Aktivität

Die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) wurde als Parameter für das Ausmaß der Infiltration ischämer Gewebe mit neutrophilen Granulozyten beschrieben [Mullane et al., 1985]. Die Quantifizierung der MPO erfolgte nach der von K. M. Mullane beschriebenen Technik. Das Gewicht der gefrorenen intestinalen Probe wurde bestimmt (ca. 100 mg) und die Probe in 4 ml 0,5%-igem Hexadecyltrimethylammonium-Bromid bei 4°C homogenisiert und anschließend für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und mit 100 mM KH_2PO_4 versetzt, um eine finale Konzentration von ca. 1 mg/ml zu erreichen. Je 10 µl Probenvolumen wurden in die Vertiefung der Mikrotiter-Platte übertragen. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von je 200 µl Tetramethylbenzidine Liquid Substrate System (Sigma). Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl 0,5 M H_2SO_4 gestoppt und der Farbumschlag bei 450 nm gelesen. Eine Einheit der MPO-Aktivität wurde definiert als Degradation von 18 µmol H_2O_2 pro Minute bei 25°C und einem pH von 6,0. Alle Proben wurden in dreifacher Ausfertigung gemessen.

Die Bestimmung der MPO-Aktivität erfolgte in scheinoperierten Wildtyp-Mäusen sowie nach einer einstündigen Reperfusionsphase nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior. Die postischämen Tiere wurden entweder mit löslicher NTPDase oder dem Vehikel behandelt (n=3 je Gruppe).

2.6.4 NTPDase-Aktivität

Die Enzymaktivität der schockgefrorenen Mausgewebe wurde nach den von J. Sévigny [Sevigny et al., 1997] und A. A. Baykov [Baykov et al., 1988] beschriebenen Techniken bestimmt. Die Gewebeproben wurden bei 4°C in Tris-Puffer homogenisiert (95 mM NaCl / 45 mM Tris / 0.1 mM PMSF / 10 µg/mL Aprotinin, pH 7,6) und anschließend für fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen und auf eine Konzentration von ca. 800 µg/ml mit Tris-Puffer verdünnt. Zur Durchführung des Enzymassays erfolgte die Zugabe von 10 µl Probenvolumen zu einem Milliliter Reaktions-Puffer (50 mM Tris / 50 mM Imidazol / 8 mM $CaCl_2$, pH 7.5) und die Inkubation bei 37°C für drei Minuten. Durch die fakultative Zugabe von Tetramisol (5mM) zum Reaktions-Puffer wurde in einzelnen Experimenten die Hemmung der alkalischen Phosphatase erreicht [Van Belle, 1972]. Zum Start der Reaktion wurde das Substrat ATP oder ADP mit einer endgültigen Konzentration von 0,3 mM zugegeben. Die Terminierung der Reaktion erfolgte nach fünf bis 15 Minuten durch die Zugabe von 0,25 ml Malachit Grün Reagenz (Stammlösung: 10 ml 0,122 % Malachite-Grün-Hydrochlorid in 6N H_2SO_4 + 2,5 ml 7,5 % Ammonium Molybdate + 0,2 ml 11 % Tween 20). Die Lichtadsorption wurde bei 610 nm in dreifacher Ausfertigung gelesen und die Adsorption in den doppelten Referenzproben (Zugabe des Proteins nach der Terminierung der Reaktion) subtrahiert. Die Angabe der Enzymaktivität erfolgte in nmol P_i / mg Protein / min. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der von Bradford angegebenen Methode durchgeführt [Bradford, 1976].

Zusätzlich wurden Jejunumproben von systemisch mit einem rekombinanten CD39-Adenovirus infizierten Wildtyp-Mäusen untersucht. Die Gewebeproben wurden von M. Imai (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Entnahme der Organe erfolgte fünf Tage nach dem adenoviralen CD39-Gentransfer ($1x10^9$ bis $5x10^{10}$ PFU in 100 µl). Die Injektion von $1x10^9$ PFU führte in den entnommenen Lebern zu einer Verfünffachung der Kapazität zur ATP-Hydrolyse bei gleichzeitiger Halbierung der plasmatischen ATP-Konzentration [Imai et al., 1999a].

Die NTPDase-Aktivität wurde in folgenden Studiengruppen bestimmt:

1. Native Gewebe (Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Pankreas, Niere, Magen, Duodenum, Jejunum, Milz) von C57BL/6x129Svj-Mäusen
(*cd39*$^{+/+}$, *cd39*$^{-/-}$, *cd39*$^{+/-}$, n ≥ 3 je Gruppe)

2. Jejunum und Mesenterialwurzel nach intestinaler Ischämie und Reperfusion oder Scheinoperation von C57BL/6x129Svj-Mäusen
(*cd39*$^{+/+}$, lösliche NTPDase, n ≥ 3 je Gruppe)

3. Herzen nach xenogener Transplantation im Akkommodations- oder Rejektionsmodell von C57BL/6x129Svj –Mäusen
(*cd39*$^{+/+}$, Zeitverlauf, n ≥ 3 je Gruppe)

4. Leber nach Induktion einer akuten toxische Hepatitis von BALB/c-Mäusen
(Zeitverlauf, n ≥ 3 je Gruppe)

5. Jejunum nach adenoviralem CD39-Gentransfer von BALB/c-Mäusen
(Pilotstudie mit verschiedenen Titern, n=5)

2.6.5 Histologie

Formalinfixierte jejunale Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet. Die Färbung der Schnitte für die Durchlichtmikroskopie erfolgte mit Hämatoxylin und Eosin.

2.7 ENDOTHELZELL-AKTIVIERUNG DURCH NUKLEOTIDE

Humane aus Umbilikalvenen isolierte Endothelzellen (HUVEC) wurden von Cambrex (Walkersville, MD, USA) bezogen und in EGM-2 BulletKit-Medium kultiviert (Cambrex). Das Medium enthielt Human-Epidermal-Growth-Factor, Hydrokortison, Human-Fibroblast-Growth-Factor, VEGF, Ascorbinsäure, Gentamicin, Amphotericin-B, Human-Insulin-like-Growth-Factor, Heparin und 2 Vol.-% fetales Rinderserum. Die Zellen wurden nach vollständiger Konfluenz in der vierten Passage für die Experimente verwendet.

Unbehandelte sowie mit 100 µM ATP oder Uridintriphosphat (UTP) inkubierte HUVEC wurden für 10 Minuten in 3,7 Vol.-% Paraformaldehyd fixiert, für drei bis fünf Minuten mit 0,1 Vol.-% Triton X-100 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) permeabilisiert und für 20 Minuten mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, Gewicht/Volumen) geblockt. Die Färbung des Zytoskeletts erfolgte durch eine 20 minütige Inkubation mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (Molecular Probes, 20 µl Methanol-Stammlösung in 250 µl BSA 1%). Für die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurde das unter 2.4.2 beschriebene Videomikroskop verwendet. Die Experimente erfolgten in dreifacher Ausführung.

2.8 STATISTIK

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Die Berechnungen wurden mit der SPSS-Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. In der statistischen Analyse wurde für kontinuierliche Variablen der Mann-Whitney-U-Test oder der Student-t-Test im Falle einer Gauss'schen Verteilung verwendet. Die Überlebenskurven wurden nach der von Kaplan und Meier angegebenen Methode berechnet und unter Verwendung des Log-Rank-Test verglichen. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant interpretiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 NTPDase-AKTIVITÄT IN MURINEN GEWEBEN

3.1.1 Native Mausgewebe

Die gesamte NTPDase-Aktivität der untersuchten Proteinpräparationen zeigte, ebenso wie der Anteil der NTPDase 1 und die Substratspezifität, eine erhebliche organspezifische Variabilität. Während rund 90 % der NTPDase-Aktivität der Lunge und der Milz auf die NTPDase 1 entfielen, führte der cd39-Mangel nur zu einer geringen quantitativen Änderung der Nukleotidase-Aktivität der Leber und des Herzens. Gleichzeitig betrug die spezifische Aktivität in den beiden letztgenannten Organen für das Substrat ADP nur rund 10% der Aktivität für ATP. In der Milz, im Duodenum und in der Lunge hingegen betrug die spezifische Aktivität für ADP mehr als 60% der Aktivität für ATP.

Der cd39-Mangel führte zu einer signifikanten Verminderung der NTPDase-Aktivität des Gehirns der *cd39*-null Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (ATP: 106,3 ± 27,49 vs. 151,76 ± 9,73 nmol Pi / mg / min, $p=0,027$; ADP: 7,14 ± 0,59 vs. 25,15 ± 3,72 nmol P_i / mg / min, $p<0,001$; Abbildung 10). Die Substratspezifität war deutlich zu Gunsten des ATP verschoben.

Die pulmonale substratspezifische Nukleotidase-Aktivität für ADP betrug 62% der Aktivität für ATP in Wildtyp-Mäusen. Insgesamt zeigte sich für beide Substrate eine deutliche Reduktion der Hydrolyse-Kapazität von Proteinpräparationen der *cd39*-null Mäuse gegenüber den Kontrollen (ATP: 43,1 ± 2,13 vs. 447,29 ± 3,49 nmol P_i / mg / min, $p<0,001$; ADP: 3,53 ± 0,57 vs. 277,43 ± 8,43 nmol P_i / mg / min, $p<0,001$; Abbildung 11).

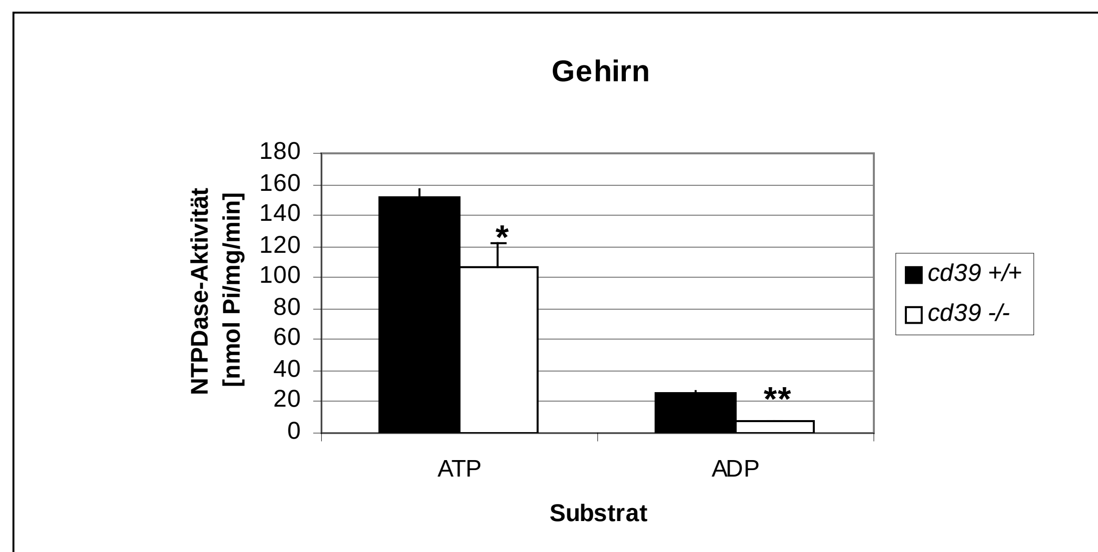


Abbildung 10: NTPDase-Aktivität des Gehirns. Die Nukleotidase-Aktivität nativer Gehirne von Wildtyp- (cd39 +/+) und cd39-null (cd39 -/-) Mäusen zeigte eine deutliche Substratspezifität für Adenosintriphosphat (ATP) gegenüber Adenosindiphosphat (ADP). Der cd39-Mangel führte zu einer signifikanten Reduktion der Nukleotid-Hydrolyse (: p=0,027 vs. cd39+/+, **: p<0,001 vs. cd39+/+, NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat).*

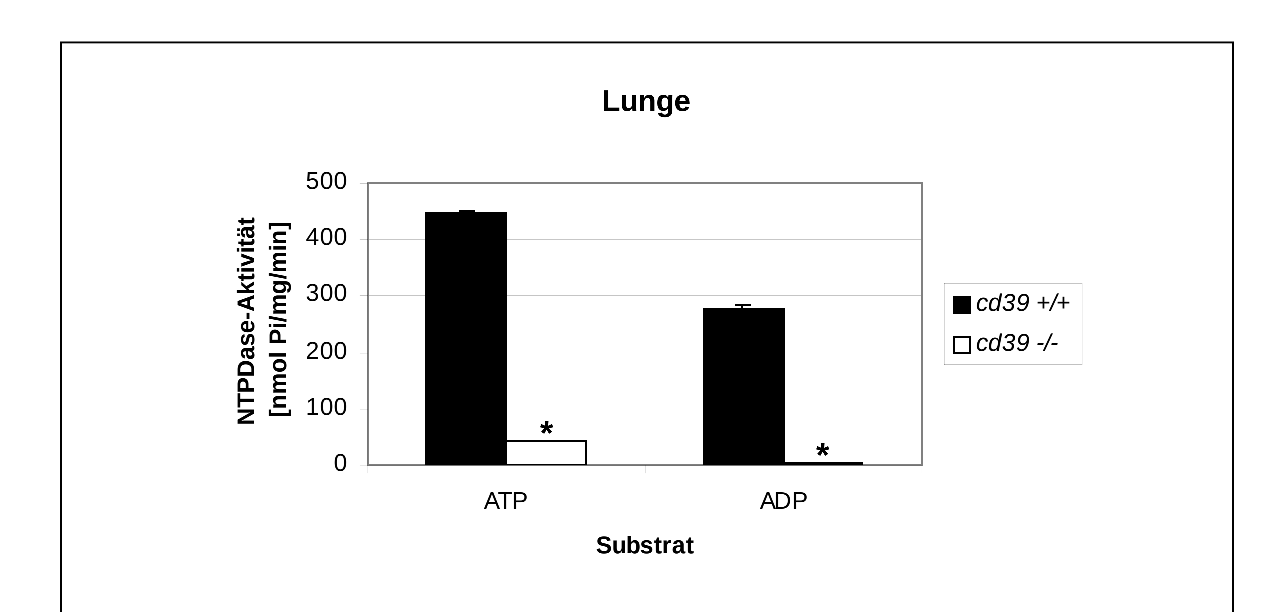


Abbildung 11: NTPDase-Aktivität der Lunge. Der cd39-Mangel führte in nativen Lungen von cd39-null (cd39 -/-) Mäusen zu einem nahezu vollständigen Verlust der Nukleotidase-Aktivität (: p<0,001 vs. Wildtyp (cd39 +/+), NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, cd39 +/+: Wildtyp, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat).*

Native Herzen zeigten mit dem Substrat ATP die höchste NTPDase-Aktivität aller untersuchten Organe mit einer hohen Substratspezifität (Abbildung 12). Der Verlust der vaskulären NTPDase in *cd39*-null Mäusen führte zu keiner Änderung der kardialen Aktivität (ATP: 522,99 ± 154,63 vs. 462,59 ± 118,48 nmol P_i / mg / min, p=0,263; ADP: 39,38 ± 41,03 vs. 49,61 ± 28,0 nmol P_i / mg / min, p=0,335).

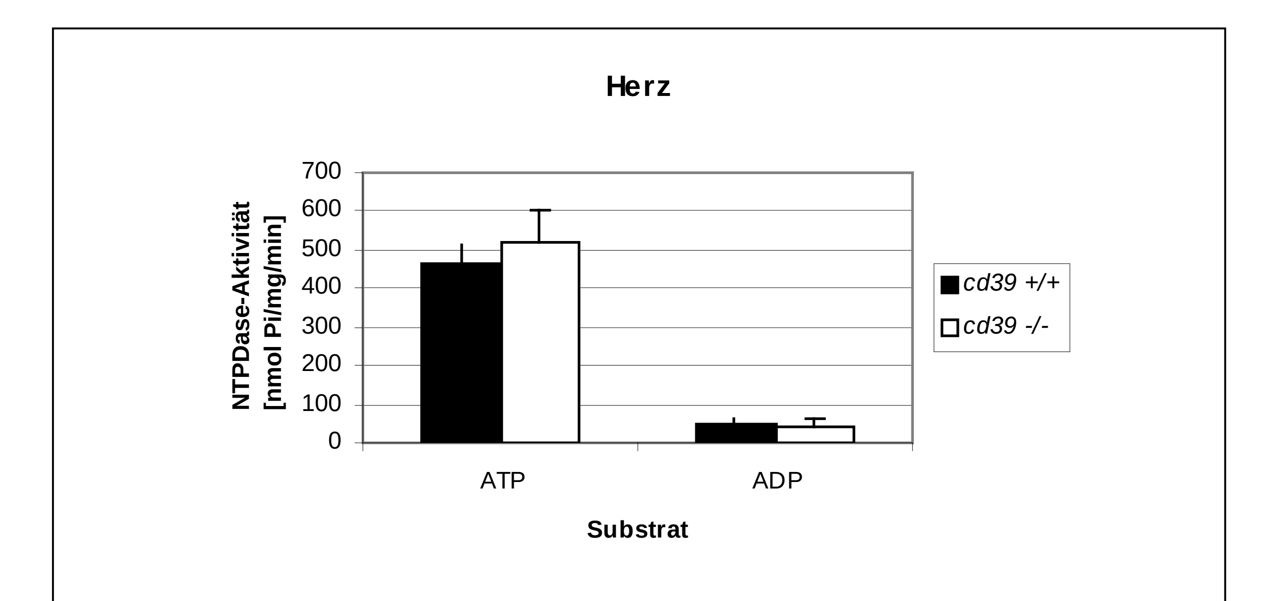


Abbildung 12: NTPDase-Aktivität des Herzens. Das Herz zeigte, mit einer deutlichen Substratspezifität für Adenosintriphosphat (ATP), die höchste Nukleotidase-Aktivität aller untersuchten Organe. Der cd39-Mangel führte zu keiner messbaren Veränderung der Nukleotid-Hydrolyse-Aktivität (NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, cd39 +/+: Wildtyp, cd39 -/-: cd39-null, ADP: Adenosindiphosphat).

Die Nukleotidase-Aktivität der nativen Wildtyp-Leber zeigte ebenfalls eine deutliche Substratspezifität für ATP, die sich in den *cd39*-null Organen unverändert darstellte (ATP: 134,02 ± 13,85 vs. 136,7 ± 14,09 nmol P_i / mg / min, p=0,413; Abbildung 13). Die Aktivität für das Substrat ADP betrug in den Wildtyp-Organen nur 9 % der ATP-Aktivität und zeigte eine signifikante Reduktion in den *cd39*-null Lebern (ADP: 11,9 ± 1,08 vs. 4,13 ± 0,59 nmol P_i / mg / min, p<0,001).

Wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase durch die Zugabe von Tetramisol gehemmt, so verringerte sich die NTPDase-Aktivität für ATP in beiden Genotypen gleichermaßen um rund 60 %.

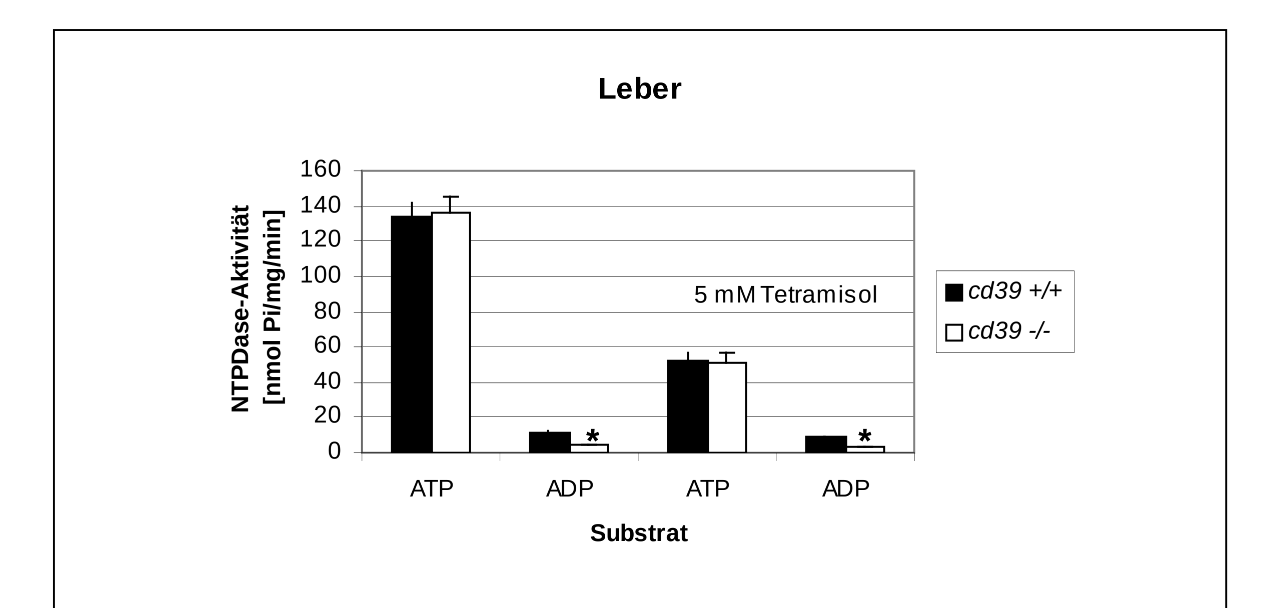


Abbildung 13: NTPDase-Aktivität der Leber. Die deutliche Substratspezifität der Leber für Adenosintriphosphat (ATP) blieb auch nach Hemmung der alkalischen Phosphatase durch Tetramisol erhalten. Der cd39-Mangel führte zu keiner messbaren Veränderung der ATP-Hydrolyse. Die geringe Nukleotidase-Aktivität der Leber für Adenosindiphosphat (ADP) war in cd39-null Organen weiter reduziert (: p<0,001), wurde aber durch Tetramisol nur wenig beeinflusst, (NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, cd39 +/+: Wildtyp, cd39 -/-: cd39-null).*

Die NTPDase-Aktivität des *cd39*-heterozygoten Pankreas zeigte für die beiden Substrate ATP und ADP (ATP: 71,52 ± 11,28 nmol P_i / mg / min, ADP: 23,85 ± 3,69 nmol P_i / mg / min) Werte, die im Mittel zwischen den Wildtyp- (ATP: 100,89 ± 73,15 nmol P_i / mg / min, ADP: 36,04 ± 25,39 nmol P_i / mg / min) und *cd39*-null Organen (ATP: 39,94 ± 13,96 nmol P_i / mg / min, ADP: 2,96 ± 0,77 nmol P_i / mg / min) lagen, auch wenn das Signifikanzniveau durch die hohen Standardfehler in den Wildtyp-Organen nicht erreicht wurde (Abbildung 14). Die Differenz der Nukleotidase-Aktivität zwischen den *cd39*-heterozygoten und den *cd39*-null Pankreata war für beide Substrate signifikant (ATP: $p=0,019$, ADP: $p<0,001$).

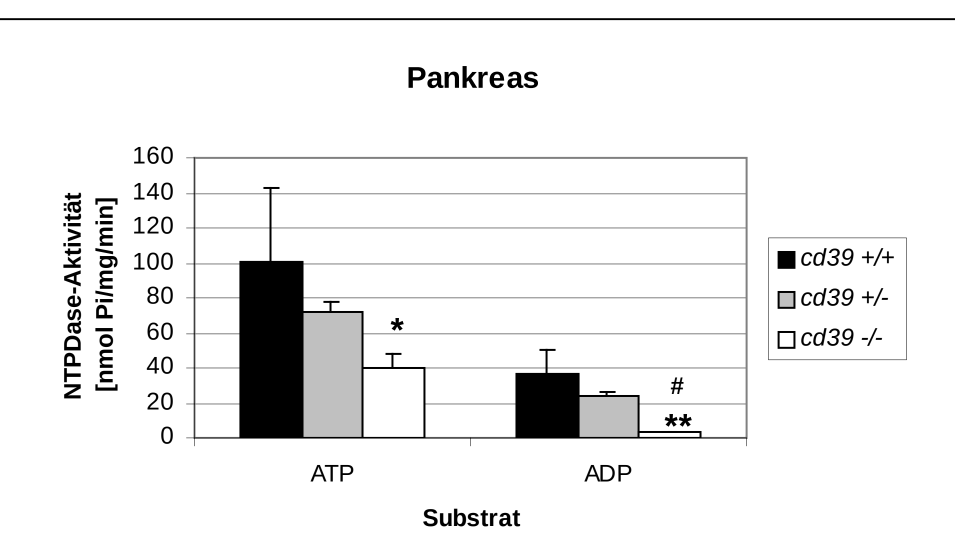


Abbildung 14: NTPDase-Aktivität des Pankreas. Die Nukleotidase-Aktivität des cd39-heterozygoten (cd39 +/-) Pankreas lag im Mittel sowohl für Adenosintriphosphat (ATP) als auch Adenosindiphosphat (ADP) zwischen den Werten der Wildtyp- (cd39 +/+) und cd39-null (cd39 -/-) Organe. Aufgrund des hohen Standardfehlers in den Wildtypen wurde das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht. Die Differenzen zwischen den heterozygoten und cd39-null Organen waren signifikant (: p=0,019 vs. cd39 +/-,**: p<0,001 vs. cd39 +/-, #: p=0,044 vs. cd39+/+, NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat).*

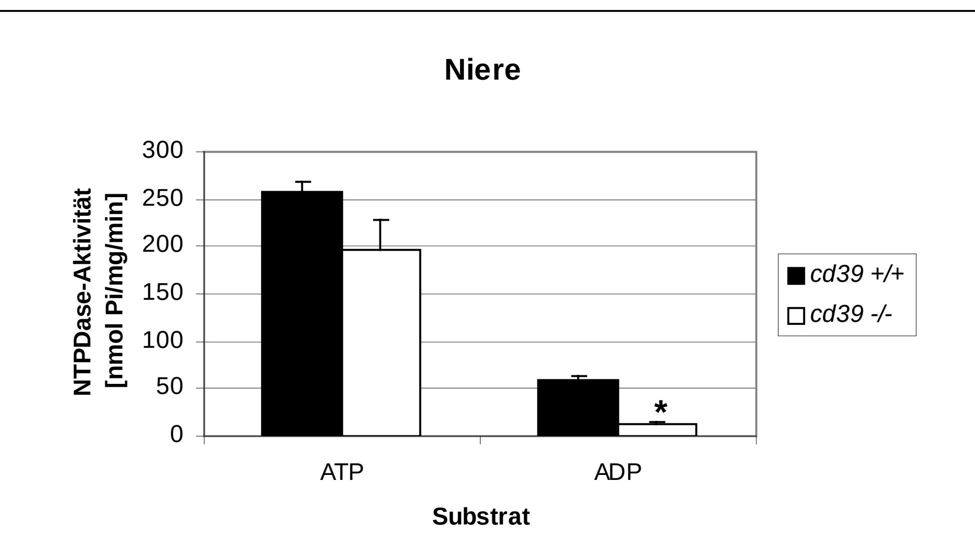


Abbildung 15: NTPDase-Aktivität der Niere. Die Nukleotidase-Aktivität der nativen Niere zeigte eine deutliche Substratspezifität für Adenosintriphosphat (ATP), die sich in den cd39-null Organen nahezu unverändert darstellte. Die Kapazität der Niere zur Hydrolyse des Adenosindiphosphat (ADP) wurde durch den cd39-Mangel weiter vermindert (: p<0,001, NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, cd39 +/+: Wildtyp, cd39 -/-: cd39-null).*

Die NTPDase-Aktivität der Niere zeigte eine Substratspezifität für ATP, die sich in den *cd39*-null Organen nahezu unverändert darstellte (ATP: 257,68 ± 22,92 vs. 196,83 ± 64,79 nmol P_i / mg / min, p=0,064; Abbildung 15). Die ADP-Hydrolyse-Kapazität der Niere wurde durch den cd39-Mangel weiter vermindert (ADP: 58,86 ± 8,39 vs. 11,83 ± 7,59 nmol P_i / mg / min, p<0,001).

Die Organe des oberen Intestinums (Magen, Duodenum und Jejunum) zeigten eine vergleichbare Verminderung der Nukleotidase-Aktivität in den *cd39*-null Tieren auf rund 60 % der Aktivität der Wildtypen für ATP. Die absolute Höhe der Enzymaktivität variierte jedoch deutlich (Magen: 354,68 ± 55,38 vs. 209,1 ± 69,0 nmol P_i / mg / min, p=0,023; Duodenum: 410,02 ± 26,5 vs. 291,51 ± 74,07 nmol P_i / mg / min, p<0,001; Jejunum: 233,64 ± 32,4 vs. 122,18 ± 29,75 nmol P_i / mg / min, p=0,019). Die ATP-Substratspezifität war im Magen am Stärksten, im Duodenum am Geringsten ausgeprägt. Die Reduktion der ADP-Hydrolyse-Kapazität in den cd39-defizienten Organen war in allen Fällen signifikant (Magen: 129,6 ± 17,07 vs. 10,72 ± 2,84 nmol P_i / mg / min, p<0,001; Duodenum: 302,08 ± 16,46 vs. 192,34 ± 83,47 nmol P_i / mg / min, p=0,020; Jejunum: 108,13 ± 28,25 vs. 41,7 ± 21,52 nmol P_i / mg / min, p=0,048). Die Kapazität des Duodenums zur ADP-Hydrolyse war die höchste aller untersuchten Organe. In Abbildung 16 ist die NTPDase-Aktivität des Jejunums wiedergegeben.

Die Nukleotidase-Aktivität der *cd39*-null Milz betrug, ähnlich wie in der Lunge, nur rund 10 % der Enzymaktivität in den Wildtyp-Kontrollen für ATP (128,97 ± 15,46 vs. 16,01 ± 2,94 nmol P_i / mg / min, p<0,001; Abbildung 17). Die Kapazität zur ADP-Hydrolyse ging in der *cd39*-null Milz fast vollständig verloren (99,83 ± 15,26 vs. 2,36 ± 0,17 nmol P_i / mg / min, p<0,001).

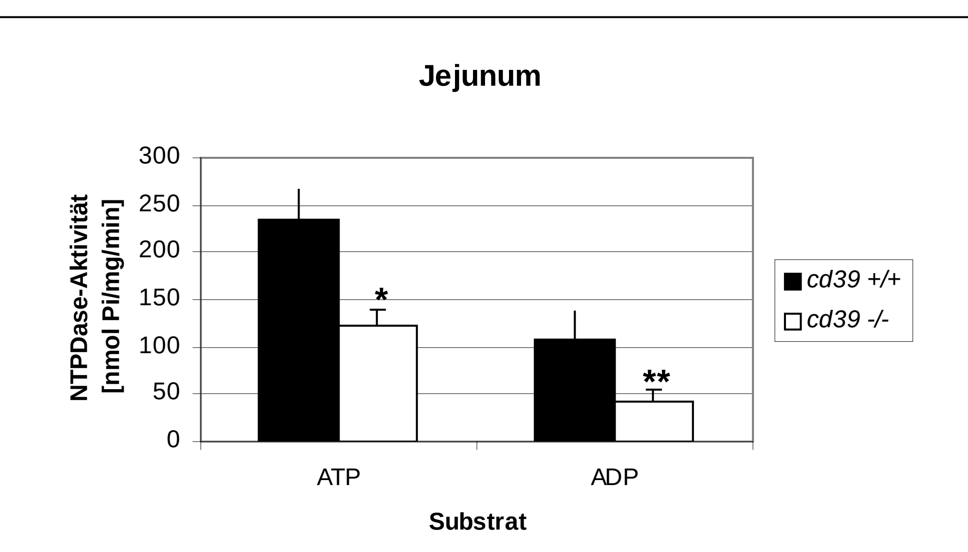


Abbildung 16: NTPDase-Aktivität des Jejunums. Das native Jejunum zeigte eine signifikante Verminderung der Nukleotidase-Aktivität für Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) in den cd39-null Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (: p=0,019 vs. cd39+/+, **: p=0,049 vs. cd39+/+, NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, cd39 +/+: Wildtyp, cd39 -/-: cd39-null).*

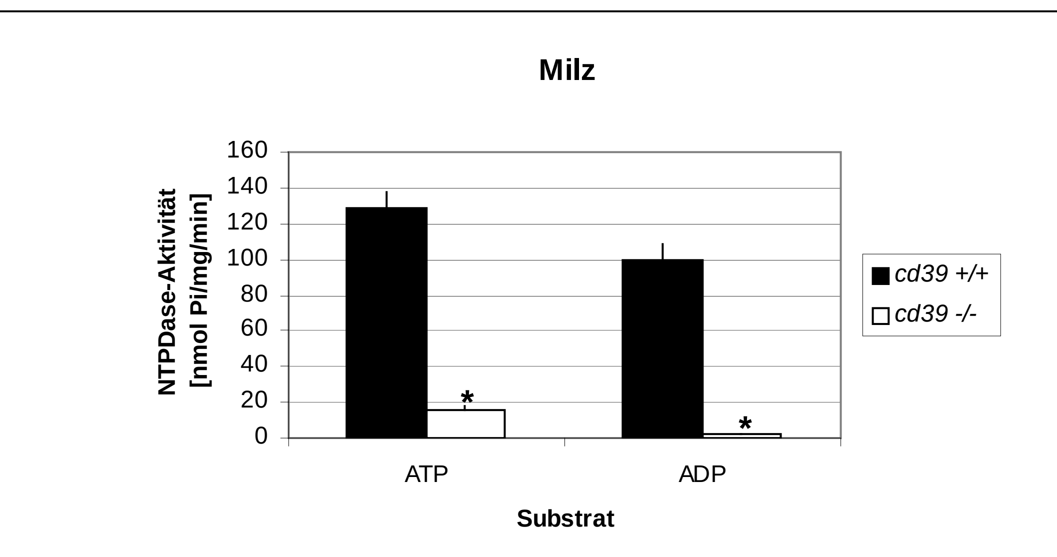


Abbildung 17: NTPDase-Aktivität der Milz. Die Milz der cd39-null Mäuse zeigte eine signifikante Verminderung der Nukleotidase-Aktivität für Adenosintriphosphat (ATP) im Vergleich zu den Wildtypen und einen nahezu vollständigen Verlust der Hydrolyse-Kapazität für Adenosindiphosphat (ADP) (: p<0,001 vs. cd39+/+, NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, cd39 +/+: Wildtyp, cd39 -/-: cd39-null).*

3.1.2 Intestinale Ischämie

Wildtyp Mäuse wurden einer 60-minütigen intestinalen Ischämie oder einer Scheinoperation unterzogen. Die jejunalen Gewebeproben der scheinoperierten Kontrollen zeigten sowohl zum Zeitpunkt der „Reperfusion“ (Sham 0’) als auch 60 Minuten später (Sham 60’) eine stabile Nukleotidase-Aktivität (ATP: 220,35 ± 33,74 vs. 188,94 ± 20,51 nmol P_i / mg / min, p=0,235; ADP: 102,75 ± 20,43 vs. 82,06 ± 15,51 nmol P_i / mg / min, p=0,233), die sich im Niveau der nativen Organe bewegte (siehe 3.1.1). Die Proteinpräparationen des ischämen Jejunums wiesen weder zum Zeitpunkt der Freigabe des Blutstromes (IRI 0’; ATP: 183,50 ± 8,73 nmol P_i / mg / min, p=0,175; ADP: 85,08 ± 2,17 nmol P_i / mg / min, p=0,219) noch nach einer 60-minütigen Phase der Reperfusion (IRI 60’; ATP: 216,42 ± 16,58 nmol P_i / mg / min, p=0,461; ADP: 108,50 ± 7,45 nmol P_i / mg / min, p=0,402) eine Verminderung der NTPDase-Aktivität gegenüber den Sham 0’-Tieren auf (Abbildung 18).

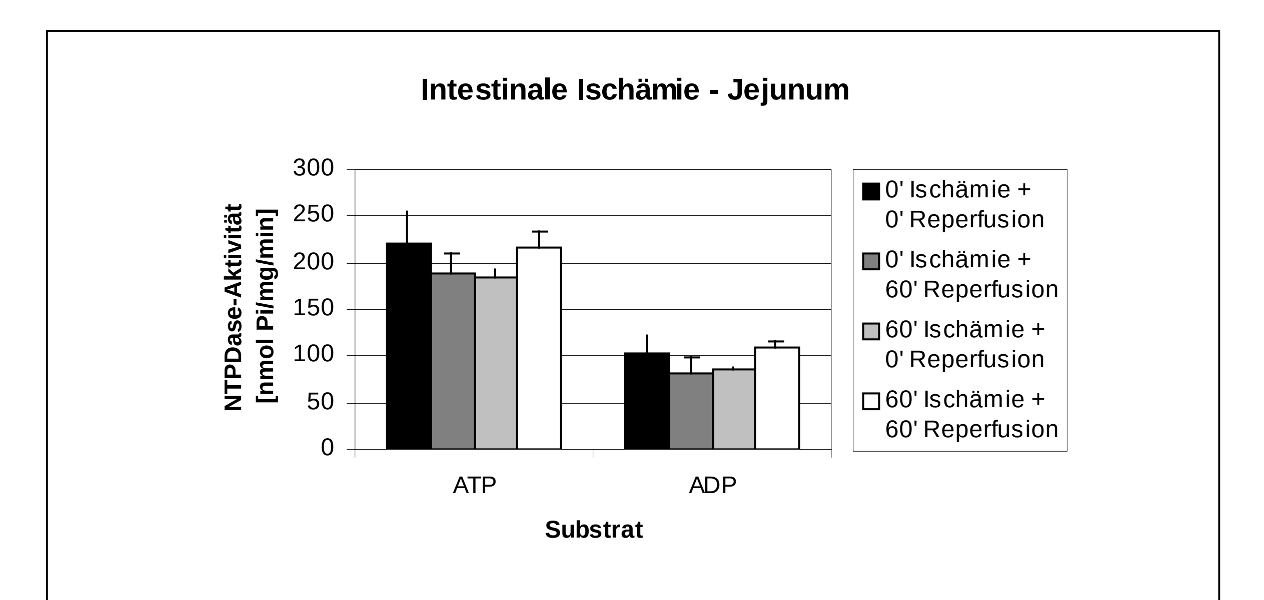


Abbildung 18: NTPDase-Aktivität des Jejunums nach intestinaler Ischämie. Das Jejunum zeigte nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior (60’ Ischämie) weder zum Zeitpunkt der Reperfusion (0’ Reperfusion) noch nach 60-minütiger Reperfusion (60’ Reperfusion) eine signifikante Verminderung der Nukleotidase-Aktivität im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen (0’ Ischämie) (NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat).

Umgekehrt führte die Behandlung der ischämen Tiere vor Reperfusion mit einer Einmaldosis löslicher NTPDase zu keiner messbaren Erhöhung der Nukleotidase-Aktivität des Jejunums zum Zeitpunkt der Freigabe des Blutstromes (ATP: 171,23 ± 10,16 nmol P_i / mg / min, p=0,206 vs. IRI 0'; ADP: 90,90 ± 5,00 nmol P_i / mg / min, p=0,173 vs. IRI 0') oder nach 60 Minuten Reperfusion (ATP: 180,63 ± 11,20 nmol P_i / mg / min, p=0,425 vs. IRI 0'; ADP: 90,18 ± 9,30 nmol P_i / mg / min, p=0,311 vs. IRI 0').

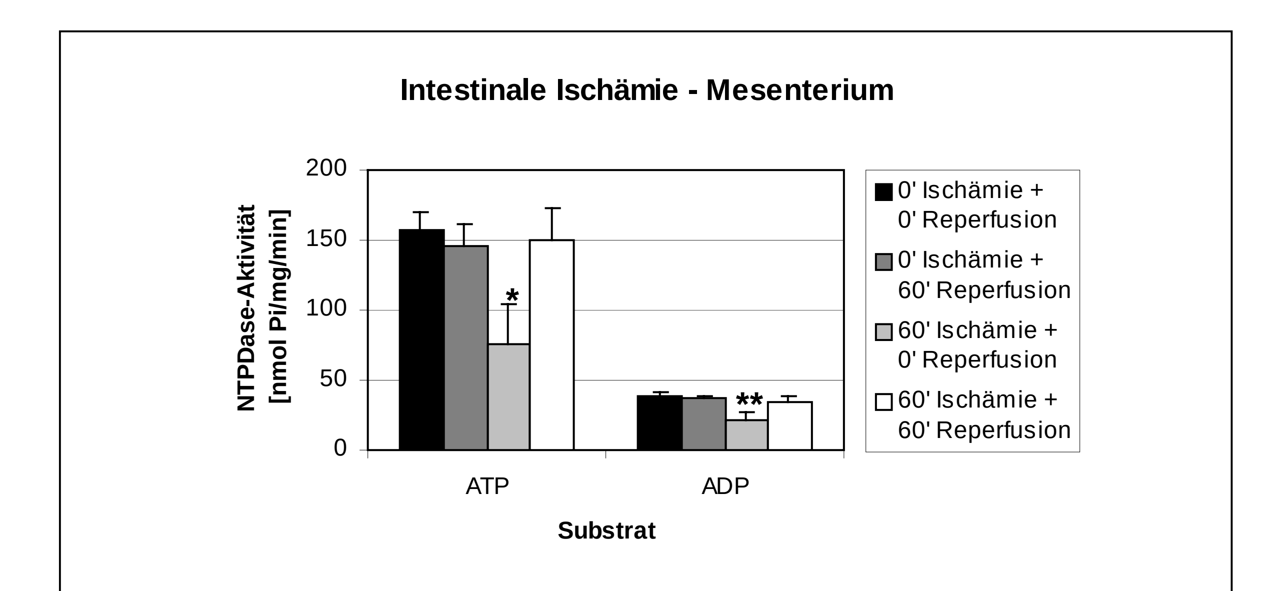


Abbildung 19: NTPDase-Aktivität des Mesenteriums nach intestinaler Ischämie. Das Mesenterium zeigte nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior (60' Ischämie) zum Zeitpunkt der Reperfusion (0' Reperfusion) einen signifikanten Abfall der Nukleotidase-Aktivität im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen (0' Ischämie). Nach 60-minütiger Reperfusion (60' Reperfusion) fand sich eine vollständige Rekonstitution der Enzymaktivität (: p=0,033 vs. 0' Ischämie + 0' Reperfusion, **: p=0,030 vs. 0' Ischämie + 0' Reperfusion, NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat).*

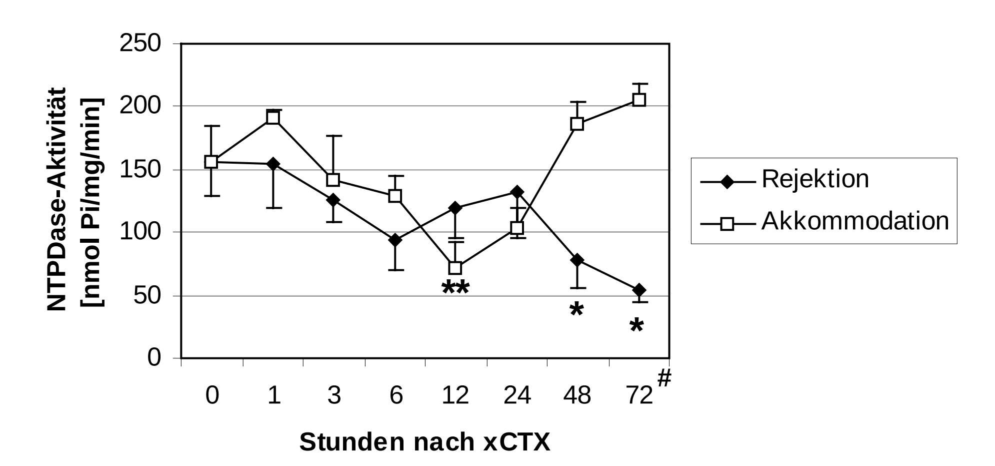
Die Homogenate der Mesenterialwurzel hingegen zeigten nach der 60-minütigen Okklusion der Arteria mesenterica superior einen signifikanten Abfall der NTPDase-Aktivität (IRI 0'; ATP: 75,64 ± 29,27 nmol P_i / mg / min, p=0,033 vs. Sham 0'; ADP: 20,77 ± 6,29 nmol P_i / mg / min, p=0,030 vs. Sham 0'; Abbildung 19) im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen zum Zeitpunkt der „Reperfusion“ (Sham 0'; ATP: 156,58 ± 13,42 nmol P_i / mg /

min, p=0,033 vs. IRI 0’; ADP: 38,85 ± 2,93 nmol P_i / mg / min, p=0,030 vs. IRI 0’). 60 Minuten nach Reperfusion fand sich eine vollständige Rekonstitution der Enzymaktivität (IRI 60’; ATP: 150,34 ± 22,12 nmol P_i / mg / min, p=0,411 vs. Sham 0’; ADP: 34,22 ± 4,37 nmol P_i / mg / min, p=0,215 vs. Sham 0’).

3.1.3 Xenogene Herztransplantation

Im Modell der heterotopen, xenogenen Herztransplantation (xCTX) zeigten die transplantierten Spenderherzen in den ersten postoperativen Stunden den Trend einer abnehmenden Nukleotidase-Aktivität für das Substrat ATP, der im Akkommodationsmodell nach 12 Stunden das Signifikanzniveau erreichte (p=0,035 vs. 0 Stunden, Abbildung 20a). Im weiteren Zeitverlauf stieg die Kapazität zur ATP-Hydrolyse im Akkommodationsmodell wieder an, während sich im Rejektionsmodell ab 48 Stunden eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität gegenüber den Ausgangswerten darstellte (48 Stunden: p=0,048 vs. 0 Stunden, Zeitpunkt der Rejektion: p=0,013 vs. 0 Stunden).

Die Kapazität der transplantierten Herzen zur ADP-Hydrolyse hingegen zeigte einen rapiden Abfall innerhalb der ersten Stunde nach Reperfusion (Rejektionsmodell: p=0,002 vs. 0 Stunden, Akkommodationsmodell: p=0,004 vs. 0 Stunden, Abbildung 20b). Eine Rekonstitution der Enzymaktivität stellte sich in den akkommodierten Spenderherzen nach 48 Stunden dar, während die Aktivität im Rejektionsmodell unverändert niedrig blieb (p=0,009 Akkommodation vs. Rejektion).



Xenogene Herztransplantation - ADP

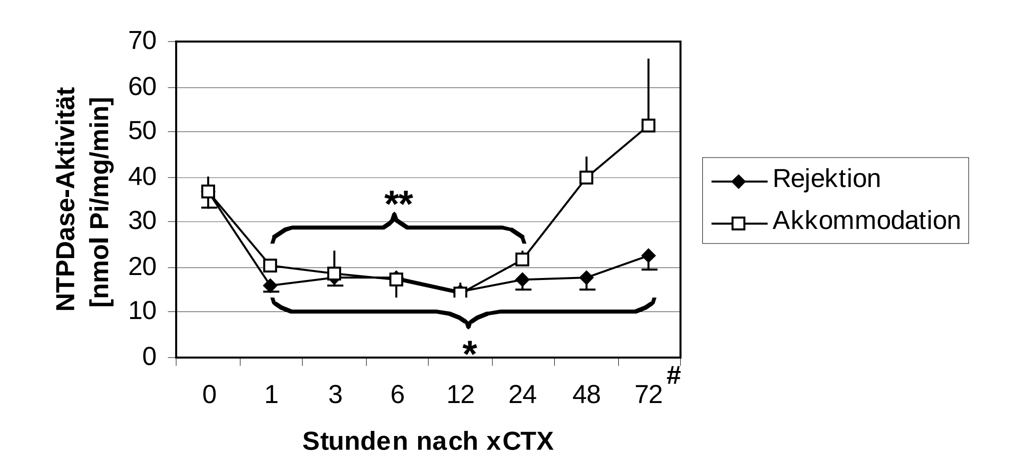


Abbildung 20: NTPDase-Aktivität der Spenderherzen nach xenogener Transplantation. a) Nach xenogener Transplantation (xCTX) zeigten die Spenderherzen eine im Trend abnehmende Kapazität zur Hydrolyse des Adenosintriphosphates (ATP), die im Akkommodationsmodell nach 12 Stunden das Signifikanzniveau erreichte und sich im weiteren Verlauf rekonstituierte. Im Rejektionsmodell stellte sich ab 48 Stunden eine signifikante Verminderung der Enzymaktivität dar. b) Für das Adenosindiphosphat (ADP) stellte sich in beiden Modellen eine rasche, signifikante Abnahme der Aktivität dar, die sich im Akkommodationsmodell nach 48 Stunden rekonstituierte. (: $p<0,05$ vs. 0 Stunden im Rejektionsmodell, **: $p<0,05$ vs. 0 Stunden im Akkomododationsmodell, NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, #: 72 Stunden nach xCTX oder Zeitpunkt der Abstoßung im Rejektionsmodell (58 bis 65 Stunden)).*

3.1.4 Akute toxische Hepatitis

Im Modell der akuten toxischen Hepatitis fand sich in den Lebern 24 Stunden nach Sensibilisierung mit D-gal und LPS-Injektion ein signifikanter Abfall der NTPDase-Aktivität gegenüber der basalen Enzymaktivität (ATP, 5mM Tetramisol: 41,09 ± 5,01 vs. 12,61 ± 1,91 nmol P_i / mg / min, p=0,012; ADP, 5mM Tetramisol: 8,37 ± 0,37 vs. 4,00 ± 0,37 nmol P_i / mg / min, p=0,002; Abbildung 21). 48 Stunden nach der Intoxikation zeigten die Organe der überlebenden Tiere eine vollständige Rekonstitution der Nukleotidase-Aktivität für ATP und einen Trend zu einer steigenden ADP-Hydrolyse-Kapazität.

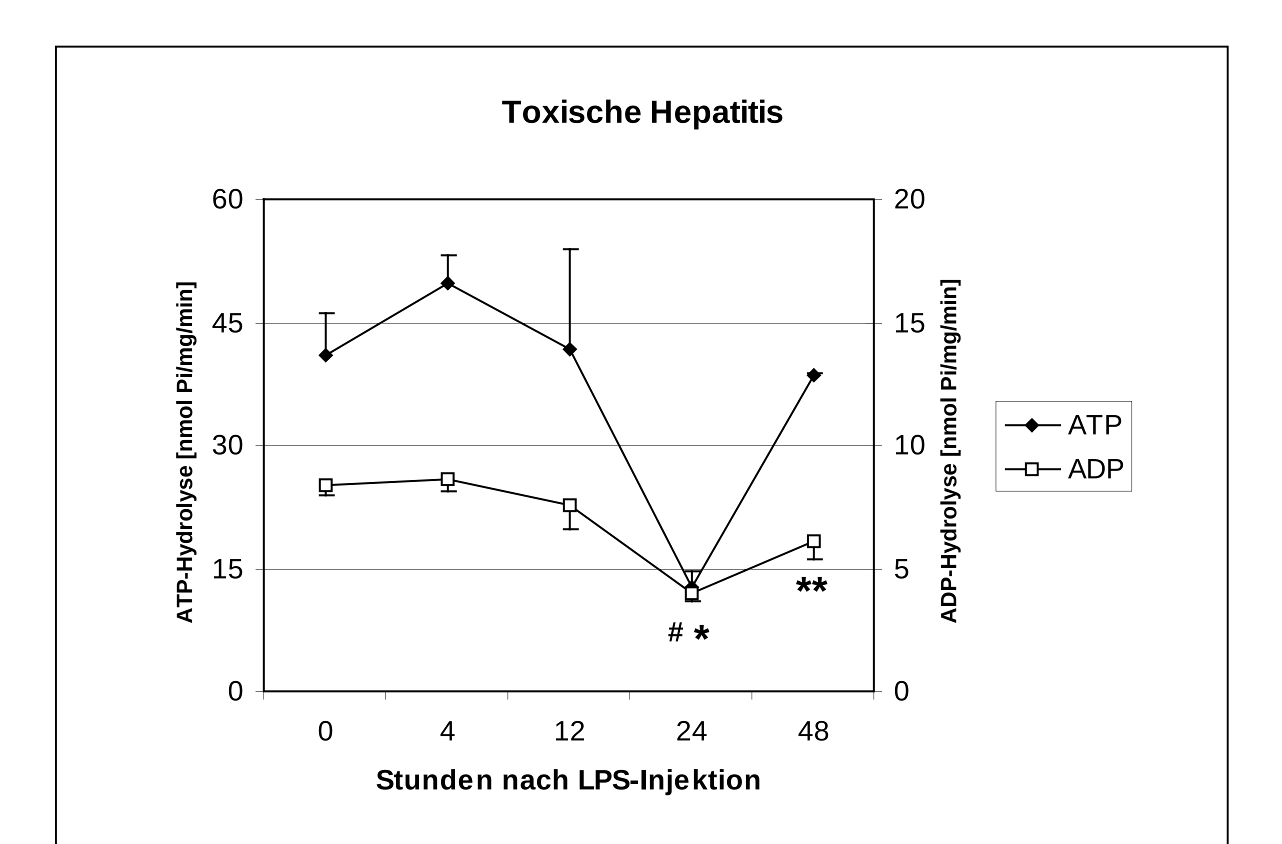


*Abbildung 21: NTPDase-Aktivität der Leber in der akuten toxischen Hepatitis. 24 Stunden nach Sensibilisierung mit 2-Amino-2-Deoxy-D-Galaktose und Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) zeigte die Leber einen signifikanten Abfall der Hydrolyse-Kapazität für Adenosintriphosphat (ATP, linke Achse) und Adenosindiphosphat (ADP, rechte Achse). Die Lebern der überlebenden Tiere wiesen 48 Stunden nach Injektion eine vollständige Rekonstitution der Enzymkapazität für ATP auf (#: p=0,012 vs. 0 Stunden für ATP, *: p=0,002 vs. 0 Stunden für ADP, **: p=0,026 vs. 0 Stunden für ADP, Pi: freies Phosphat).*

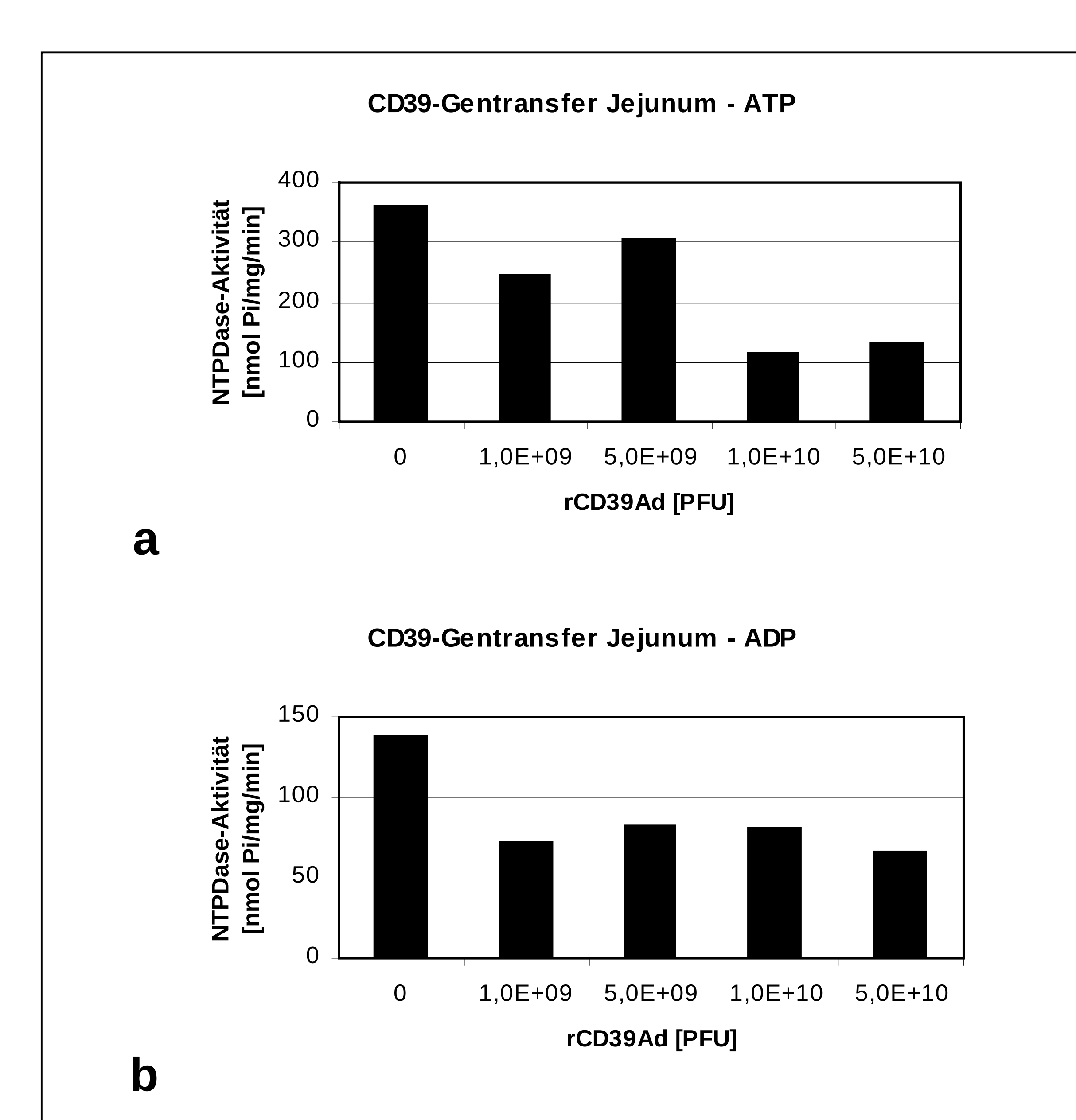


Abbildung 22: NTPDase-Aktivität des Jejunums nach adenoviralem CD39-Gentransfer. Unabhängig von der Quantität der rekombinanten CD39-Adenoviren (rCD39Ad) zeigte sich fünf Tage nach Injektion eine Verminderung der Nukleotidase-Aktivität des Jejunums im Vergleich zu der nativen Kontrolle (0). a) Substrat: Adenosintriphosphat (ATP), b) Substrat: Adenosindiphosphat (ADP) (NTPDase: Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase, Pi: freies Phosphat, PFU: Plaque Forming Units).

3.1.5 Adenoviraler CD39-Gentransfer

Die intravenöse Injektion der rekombinanten CD39-Adenoviren (rCD39Ad) führte entgegen der Erwartung nicht zu einem Anstieg der jejunalen NTPDase-Aktivität. Unabhängig von der Quantität der injizierten rCD39Ad zeigte sich in der Pilotstudie ein deutlicher Abfall der Enzymaktivität für die beiden Substrate ATP und ADP im Vergleich zu den nativen Kontrollen (Abbildung 22).

3.2 ÜBERLEBENSRATEN IN DEN ISCHÄMIE-REPERFUSIONS-MODELLEN

3.2.1 Modell der hepatischen Ischämie

92 % der Wildtyp-Mäuse überlebten die 45-minütige komplette Ischämie der Leber für mehr als sieben Tage, während 68 % der *cd39*-heterozygoten (p<0,001 vs. *cd39*$^{+/+}$) und 92 % der *cd39*-null Mäuse (p=0,025 vs. *cd39*$^{+/-}$, p<0,001 vs. *cd39*$^{+/+}$) innerhalb von sechs Stunden nach Reperfusion verstarben (Abbildung 23). Postmortal zeigten die Wildtyp-Mäuse fleckförmige Nekroseareale sowie eine Stauung der Sinusoide während die *cd39*-null Tiere venöse Thrombosen und den venösen Abflussgebieten entsprechende hämorrhagische Nekrosen aufwiesen (Abbildung 24).

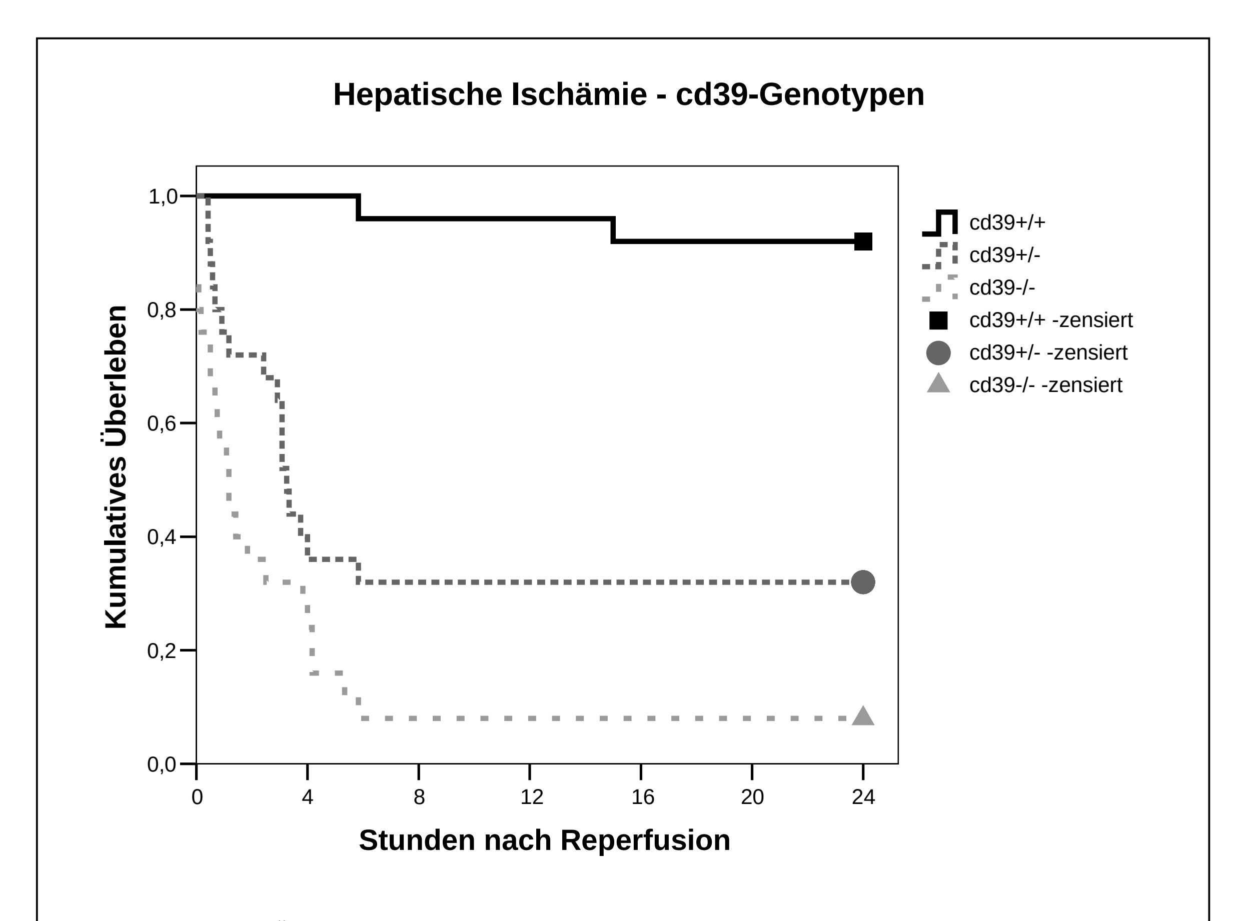


Abbildung 23: Überleben der cd39-Genotypen nach hepatischer Ischämie. 92 % der Wildtyp-Mäuse (cd39$^{+/+}$*) überlebten die 45-minütige hepatische Ischämie. Die signifikant verminderten Überlebensraten der cd39-heterozygoten (cd39*$^{+/-}$*) und cd39-null Mäuse (cd39*$^{-/-}$*) betrugen 32 und 8 %. Für die grafische Darstellung wurde die Nachbeobachtungszeit nach 24 Stunden zensiert.*

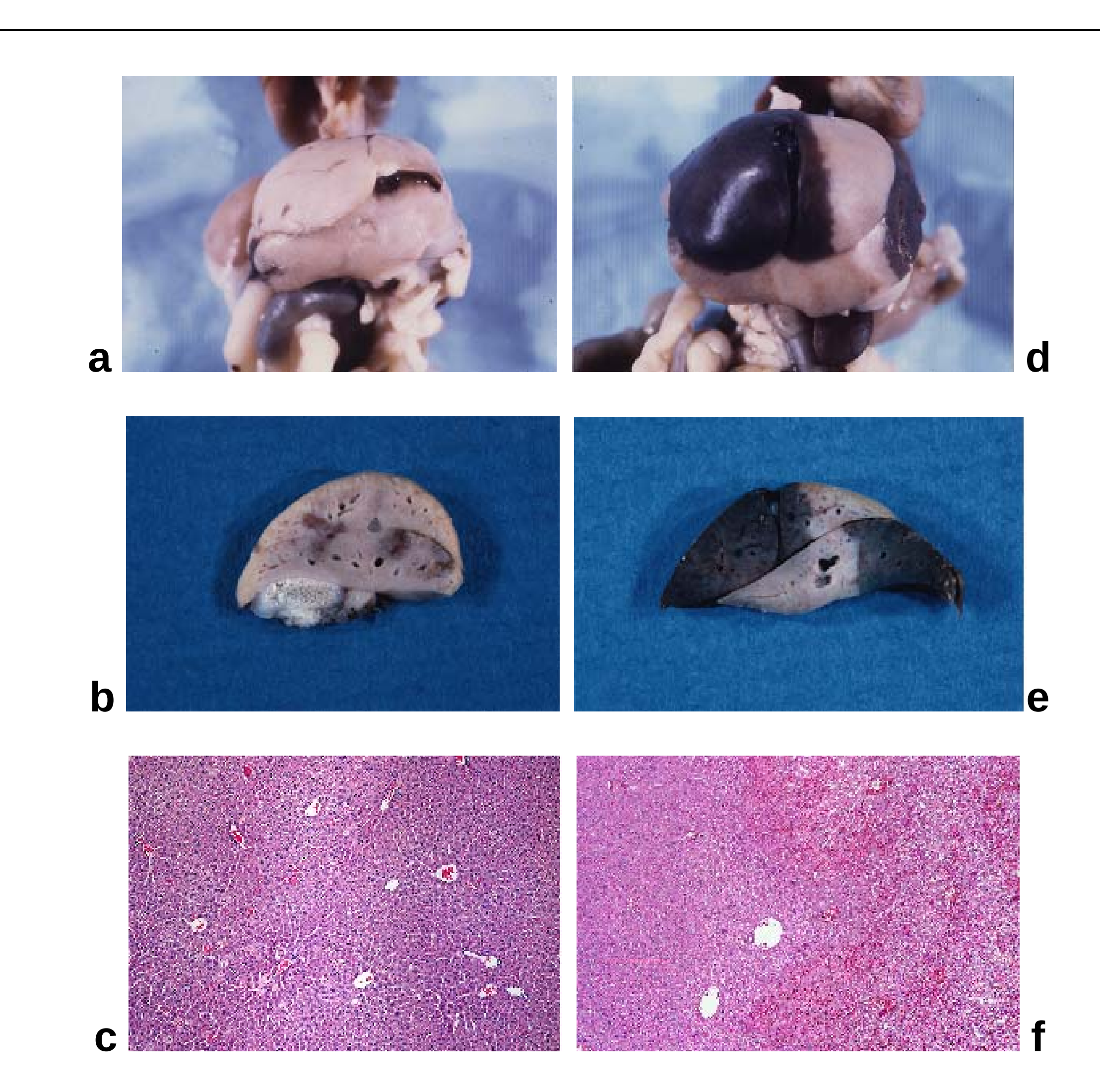


Abbildung 24: Postmortale Befunde nach hepatischer Ischämie. In der Abbildung sind repräsentative postmortale Befunde nach einer 45-minütigen hepatischen Ischämie von Wildtyp- (linke Spalte, a-c) und cd39-null Mäusen (rechte Spalte, d-f) wiedergegeben. Makroskopisch zeigen das Oberbauchpräparat (a) und die Leberschnittfläche (b) der Wildtyp-Maus vereinzelte, fleckförmige Nekroseareale. Im mikroskopischen Bild (Vergrößerung: 100-fach, c) findet sich eine weitgehend erhaltene Leberarchitektur mit den Zeichen einer sinusoidalen Stauung. Die makroskopischen Befunde der cd39-null Maus (Oberbauchpräparat: d, Leberschnittfläche: e) zeigen segmentale, den venösen Abflussgebieten entsprechende Nekroseareale. In der Histologie (Vergrößerung: 100-fach, f) finden sich hämorrhagische Nekrosen.

Sowohl durch Substitution mit löslicher NTPDase als auch durch Supplementation mit Adenosin und Amrinon ließ sich in den *cd39*-heterozygoten Tieren eine Überlebensrate von 67 % erreichen (lösliche NTPDase: p=0,086 vs. *cd39*$^{+/+}$, Adenosin/Amrinon: p=0,077 vs. *cd39*$^{+/+}$, Abbildung 25).

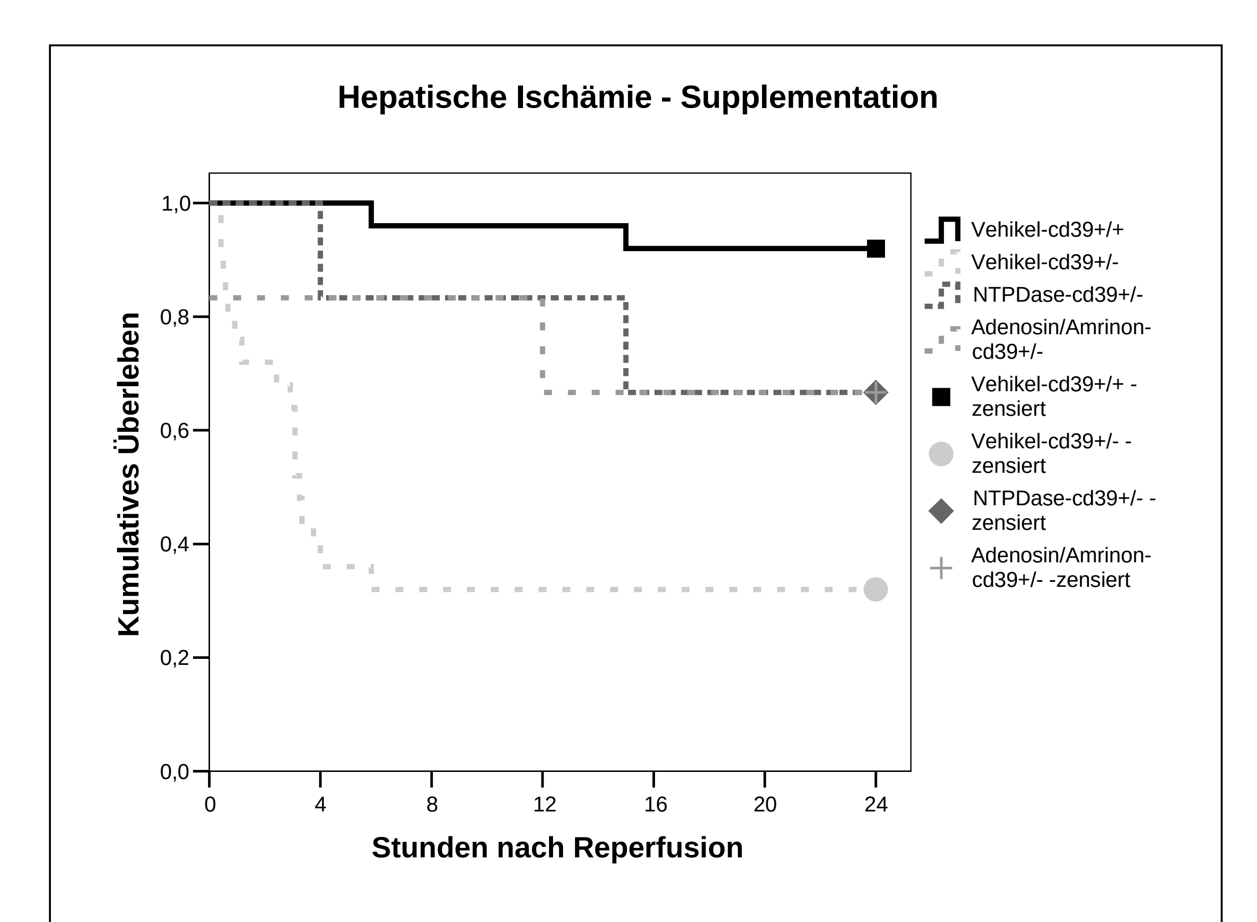


Abbildung 25: Überleben nach hepatischer Ischämie unter NTPDase- oder Adenosin-Substitution. Die Überlebensrate der nativen Wildtyp-Mäuse (cd39$^{+/+}$*) betrug 92 % nach 45-minütiger hepatischer Ischämie. Das kumulative Überleben der cd39-heterozygoten Tiere (cd39*$^{+/-}$*) war signifikant vermindert und betrug 32 %. Durch Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (Apyrase, NTPDase) oder Applikation von Adenosin und Amrinon konnten für cd39-heterozygote Mäuse Überlebensraten von 67 % erreicht werden. Für die grafische Darstellung wurde die Nachbeobachtungszeit nach 24 Stunden zensiert.*

Nach adenoviralem A20-Gentransfer zeigten die *cd39*-null Mäuse eine signifikant verlängerte Überlebenszeit gegenüber ihren Kontrollen (p=0,005 vs. native *cd39*$^{-/-}$, p=0,040 vs. β-gal), ein Langzeitüberleben ließ sich jedoch nicht erreichen (Abbildung 26).

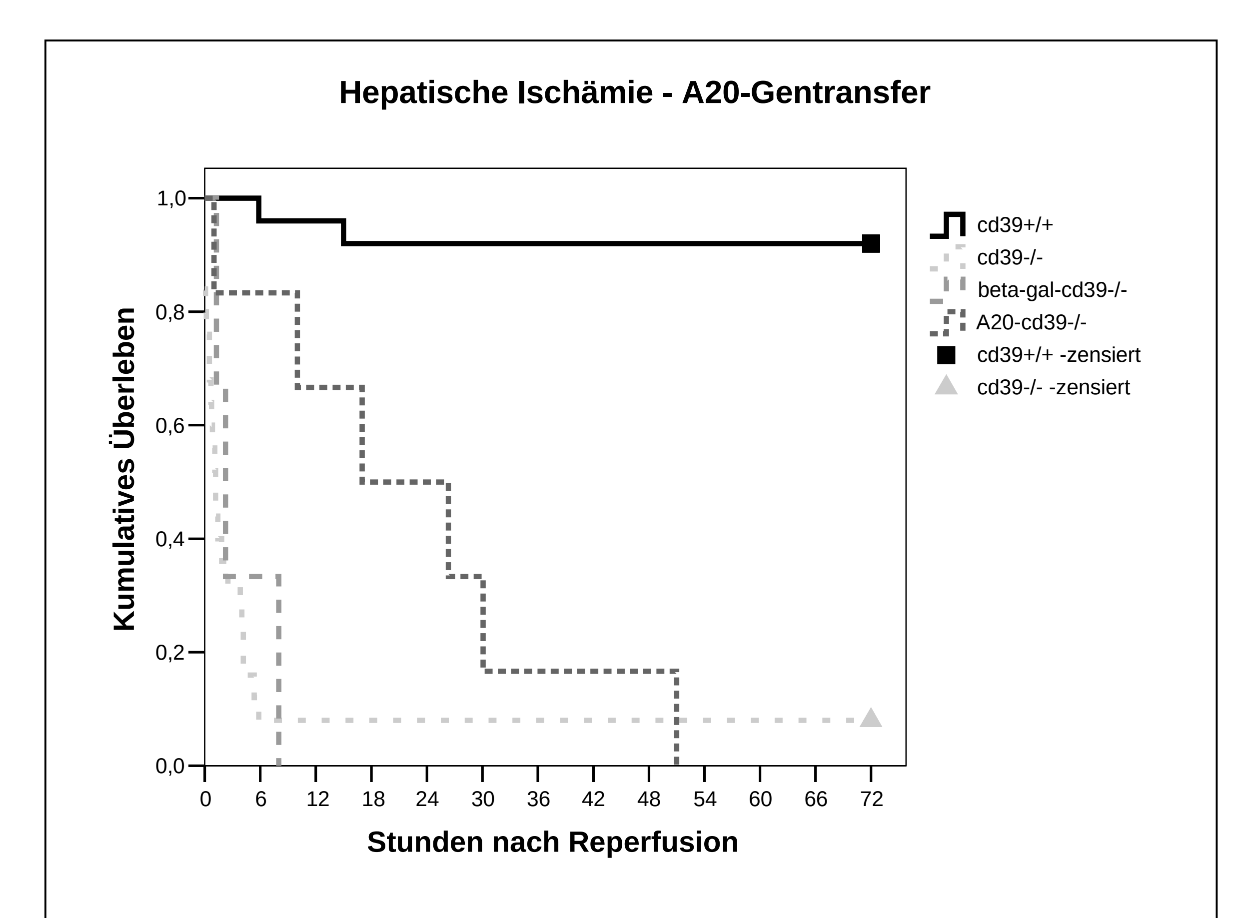


Abbildung 26: Überleben nach hepatischer Ischämie und A20-Gentransfer. Die Überlebensrate der nativen Wildtyp-Mäuse (cd39$^{+/+}$*) betrug 92 % nach 45-minütiger hepatischer Ischämie. Das kumulative Überleben der cd39-null Tiere (cd39*$^{-/-}$*) war signifikant vermindert und betrug 8 %. Alle mit dem Kontrollvirus (β-Galaktosidase, beta-gal) infizierten cd39-null Mäuse verstarben innerhalb von acht Stunden. Nach A20-Gentransfer zeigten die cd39-null Mäuse eine signifikant gegenüber ihren Kontrollen verlängerte Überlebenszeit bis zu 51 Stunden. Für die grafische Darstellung wurde die Nachbeobachtungszeit nach 72 Stunden zensiert.*

3.2.2 Modell der intestinalen Ischämie

60 % aller Wildtyp-Mäuse starben innerhalb von 24 Stunden nach der 60-minütigen intestinalen Ischämie (Abbildung 27). Die Applikation einer einzigen Dosis löslicher NTPDase unmittelbar vor Freigabe der Reperfusion führte zu einem Überleben aller Wildtyp-Versuchstiere (p=0,038 vs. native Kontrollen).

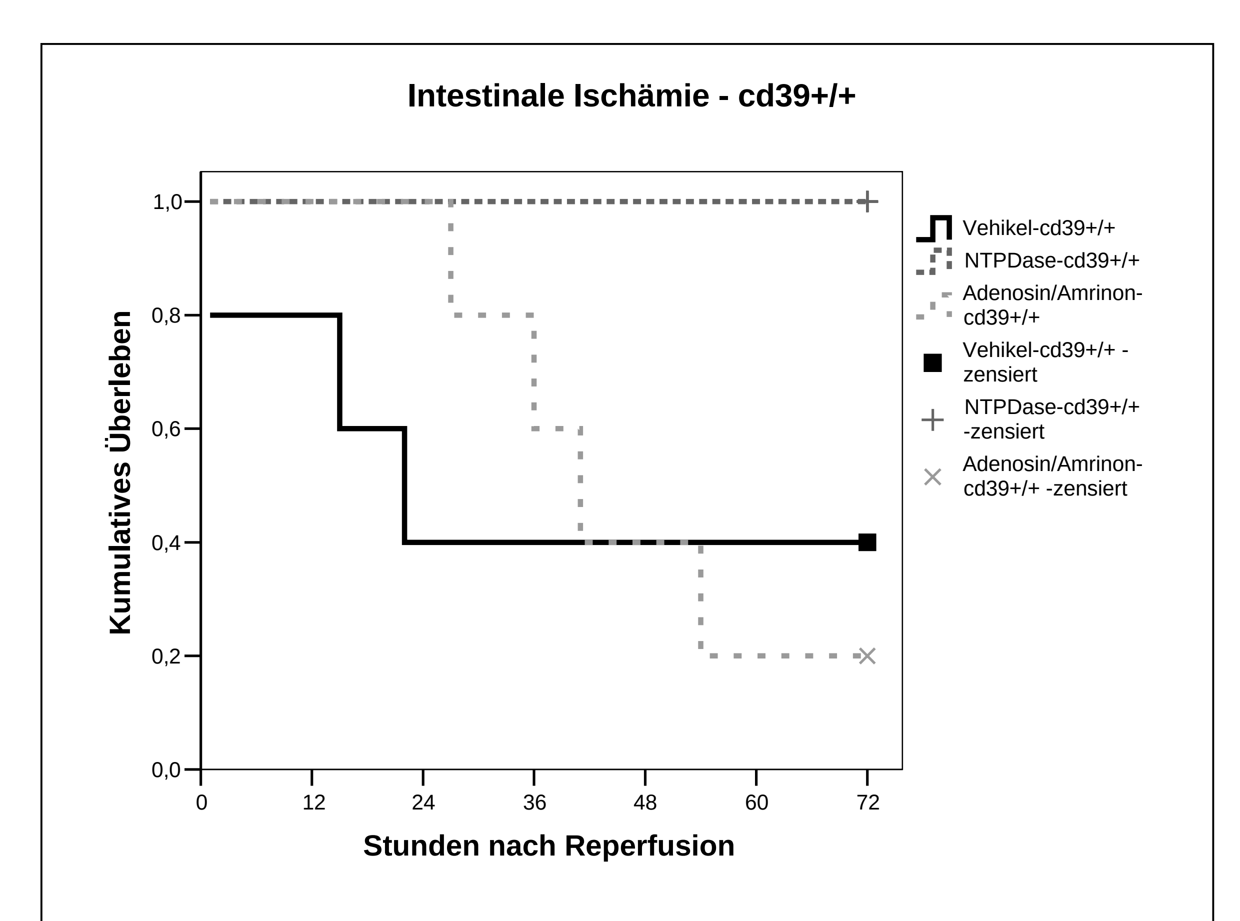


Abbildung 27: Überleben nach intestinaler Ischämie in Wildtyp-Mäusen. Die Überlebensrate der kochsalzbehandelten Wildtyp-Mäuse (Vehikel-cd39$^{+/+}$) betrug 40 % nach 60-minütiger intestinaler Ischämie. Die Substitution einer einzigen Dosis löslicher Nukleotidase vor Freigabe der Reperfusion (NTPDase) führte zu einer Überlebensrate von 100 %. Die Supplementation mit Adenosin und Amrinon (Adenosin/Amrinon) hingegen erhöhte das kumulative Überleben nicht. Für die grafische Darstellung wurde die Nachbeobachtungszeit nach 72 Stunden zensiert.

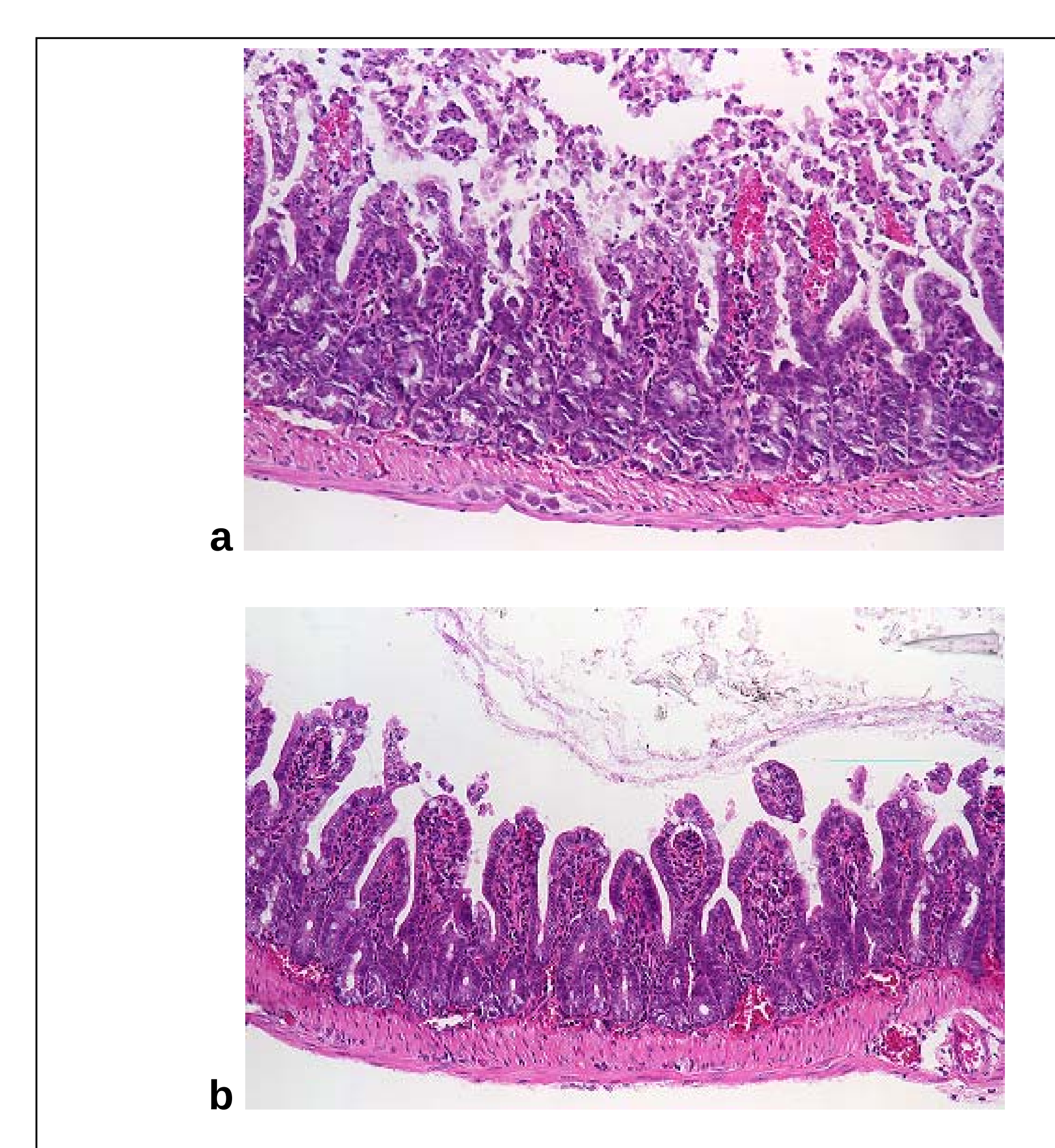


Abbildung 28: Histopathologie nach intestinaler Ischämie in Wildtyp-Mäusen. Nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior und einstündiger Reperfusion zeigten mit dem Vehikel behandelte Wildtyp-Mäuse eine erhebliche Störung der vaskulären und mukosalen Integrität mit Einblutungen, segmentalem Verlust des Epithels und einer venösen Stauung (a, Vergrößerung: 250-fach). Nach Substitution der intravaskulären Nukleotidase-Aktivität zeigte sich nur eine geringe Ablösung des Epithels im Bereich der jejunalen Villi, minimale Einblutungen und eine venöse Stauung (b, Vergrößerung: 250-fach).

Repräsentative histologische Befunde sind in Abbildung 28 wiedergegeben und zeigten eine Stunde nach Reperfusion erhebliche Störungen der vaskulären und mukosalen Integrität in

den nativen Wildtyp-Kontrollen mit segmentalem Verlust des Epithels sowie beträchtlichen Einblutungen. Die apyrasebehandelten Tiere zeigten lediglich eine geringfügige Ablösung des Epithels im Bereich der jejunalen Villi sowie minimale Einblutungen. Die Behandlung mit Adenosin und Amrinon führte zu keiner Verlängerung der Überlebenszeiten.

80 % der nativen *cd39*-heterozygoten Versuchstiere verstarben innerhalb von 24 Stunden nach Reperfusion (p=0,549 vs. native $cd39^{+/+}$). Die Substitution mit löslicher NTPDase vor Freigabe des Blutstromes führte zu keiner signifikanten Verlängerung der Überlebenszeiten (p=0, 361 vs. native $cd39^{+/-}$, Abbildung 29).

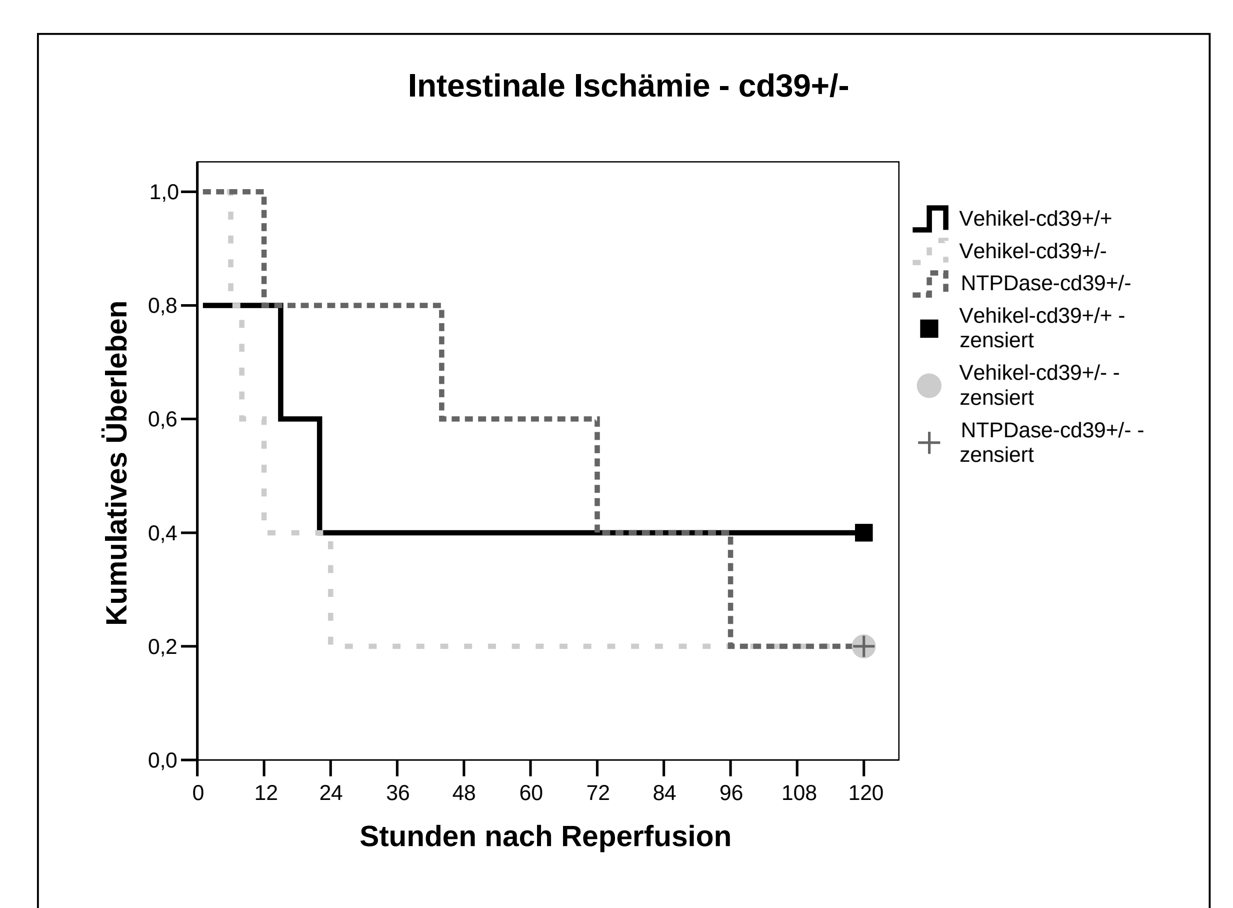


Abbildung 29: Überleben nach intestinaler Ischämie in cd39-heterozygoten Mäusen. Die Überlebensrate der nativen cd39-heterozygoten Mäuse (Vehikel-$cd39^{+/-}$) betrug 20 % nach 60-minütiger intestinaler Ischämie. Durch Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (Apyrase, NTPDase) konnte die Überlebensrate für cd39-heterozygote Mäuse nicht verbessert werden. Das kumulative Überleben der nativen Wildtyp-Mäuse (Vehikel-$cd39^{+/+}$) betrug 40 %. Für die grafische Darstellung wurde die Nachbeobachtungszeit nach 120 Stunden zensiert.

Die nativen *cd39*-null Mäuse zeigten unmittelbar nach Freigabe der SMA erhebliche intestinale Blutungen und 80 % der Versuchstiere verstarben postoperativ innerhalb von 48 Stunden (p=0,78 vs. native *cd39*$^{+/+}$).

Sowohl die einmalige als auch die repetitive Substitution mit löslicher NTPDase sowie die Supplementation mit Adenosin/Amrinon führte zu keiner Verbesserung der Überlebensraten (Abbildung 30).

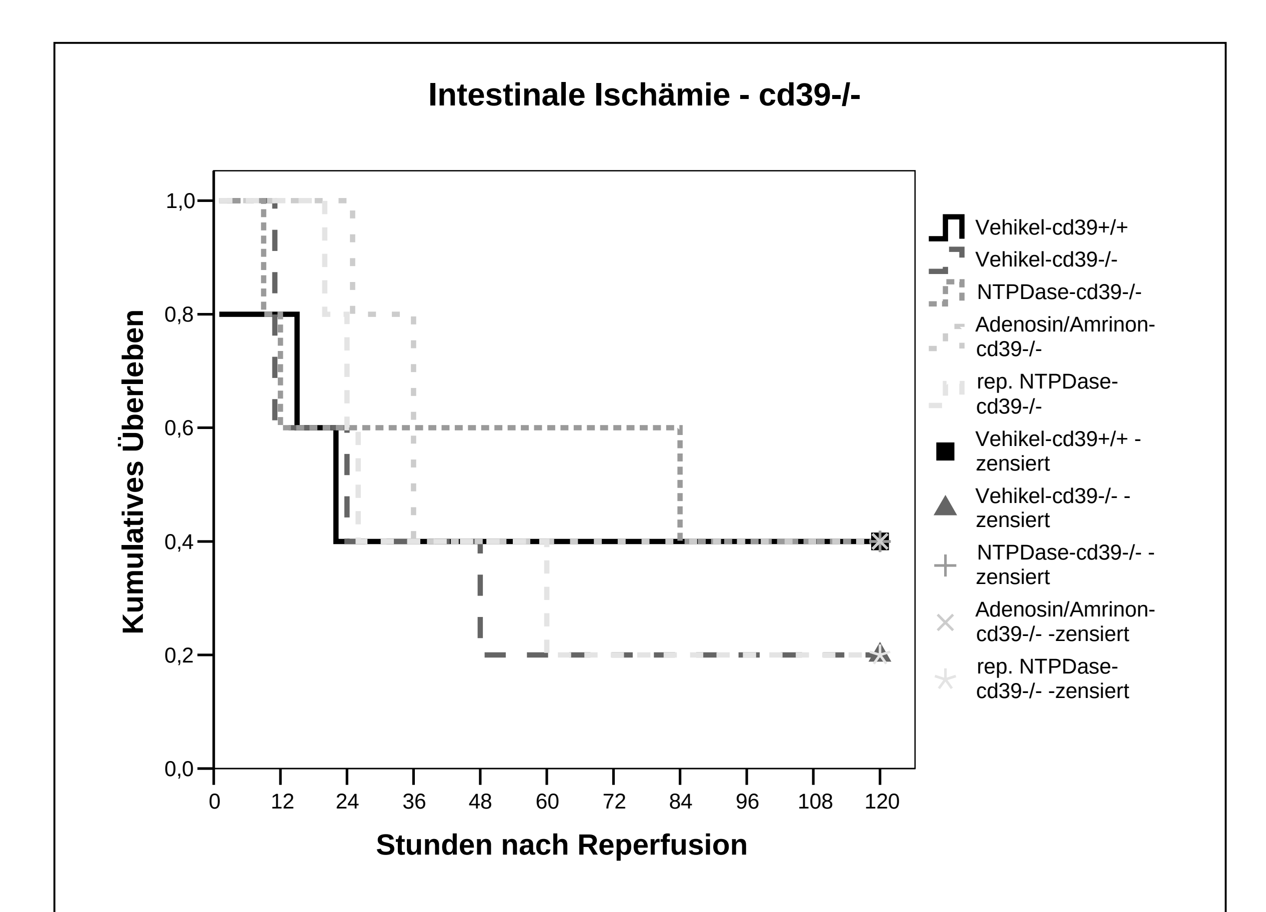


Abbildung 30: Überleben nach intestinaler Ischämie in cd39-null Mäusen. Die Überlebensrate der nativen cd39-null Mäuse (Vehikel-cd39$^{-/-}$*) betrug 20 % nach 60-minütiger intestinaler Ischämie. Sowohl durch einmalige Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (Apyrase, NTPDase) vor der Freigabe des Blutstromes als auch durch wiederholte Gabe bis 48 Stunden postoperativ (rep. NTPDase) konnte keine Verbesserung der kumulativen Überlebensrate der cd39-null Mäuse (cd39*$^{-/-}$*) erreicht werden. Die Applikation von Adenosin und Amrinon zeigte ebenfalls keine Steigerung der Überlebensrate für cd39-null Mäuse. Die Überlebensrate der nativen Wildtyp-Mäuse (Vehikel-cd39*$^{+/+}$*) betrug 40 %. Für die grafische Darstellung wurde die Nachbeobachtungszeit nach 120 Stunden zensiert.*

Die postmortalen Befunde zeigten ausschließlich in den unbehandelten *cd39*-null Tieren einen signifikanten intestinalen Blutverlust. Die Behandlung sowohl mit NTPDase als auch mit Adenosin/Amrinon verhinderten größere intestinale Blutungen in den *cd39*-null Mäusen. Alle verstorbenen Tiere zeigten ein massives intestinales Ödem und Zeichen des toxischen Schocks mit petechialen Einblutungen. Pulmonale Infarkte fanden sich postmortal nach intestinaler Ischämie bei allen nativen und einem Viertel der NTPDase-behandelten *cd39*-heterozygoten Mäuse sowie bei zwei Drittel der verstorbenen und mit einer Einmaldosis NTPDase behandelten *cd39*-null Tiere.

3.3 THROMBOZYTEN-ADHÄSION NACH INTESTINALER ISCHÄMIE

Nur eine geringe Zahl der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten zeigten sich in den untersuchten intestinalen Arteriolen und Venolen der scheinoperierten Wildtyp-Mäuse (Sham) adhärent (Abbildung 31a). In der Reperfusionsphase nach 60-minütiger intestinaler Ischämie fand sich in den mit dem Vehikel behandelten Tieren ein signifikanter Anstieg der adhärenten Thrombozyten in den postkapillären Venolen (Vehikel vs. Sham: 27,98 ± 4,99 /mm^2 vs. 4,39 ± 2,62 /mm^2, p=0,007). Dieser Anstieg konnte durch die einmalige Supplementation mit löslicher NTPDase vor der Freigabe des Blutstromes vollständig verhindert werden (2,95 ± 1,62 /mm^2, p=0,002 NTPDase vs. Vehikel). Die Änderung der Thrombozytenadhäsion in den Arteriolen erreichte nicht das Signifikanzniveau. Andererseits zeigte sich in den postischämen Arteriolen eine signifikante Zunahme der rollenden Thrombozyten im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen (Vehikel vs. Sham: 146,2 ± 25,6 /mm/s vs. 66,7 ± 2,0 /mm/s, p=0,029, Abbildung 31b). Dieser Trend fand sich unverändert auch nach Applikation der löslichen NTPDase (157,3 ± 48,6 /mm/s, p=0,088 vs. Sham). Die Anzahl der rollenden Thrombozyten in den Venolen änderte sich hingegen nicht signifikant.

Die *cd39*-null Mäuse zeigten nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior instabile Kreislaufverhältnisse und wurden deshalb von dieser Analyse ausgeschlossen.

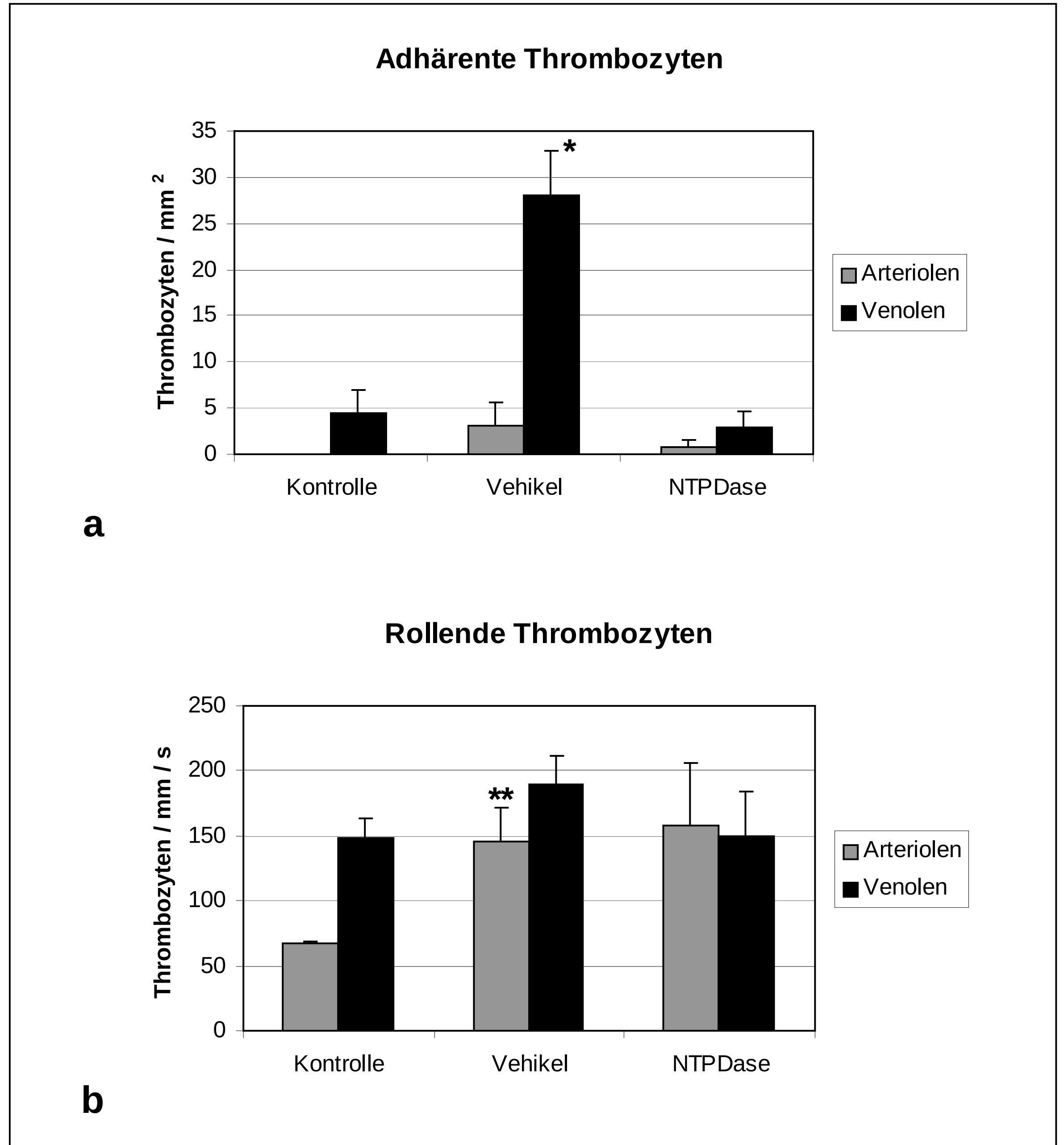


*Abbildung 31: Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen nach intestinaler Ischämie. Nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior zeigte sich in der Reperfusionsphase ein signifikanter Anstieg der adhärenten Thrombozyten in den postkapillären Venolen im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen (a, *: p=0,007 vs. Kontrolle und p=0,002 vs. NTPDase). Die Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (NTPDase) vor Freigabe des Blutstromes verhinderte diesen Anstieg. In den postischämen Arteriolen zeigte sich entsprechend eine Zunahme der rollenden Thrombozyten im Vergleich zu den Kontrollen, die im Trend auch nach Substitution der NTPDase-Aktivität unverändert bestand (b, **: p=0,029 vs. Kontrolle).*

3.4 KAPILLARLECK NACH INTESTINALER ISCHÄMIE

3.4.1 Intravitale Videomikroskopie

Die Sequestration des fluoreszenzmarkierten Albumins in das perivaskuläre Gewebe unterschied sich unter den Bedingungen einer konstanten Spülung mit angewärmter Kochsalzlösung nicht in scheinoperierten Wildtyp- und *cd39*-null Mäusen (Sham, Abbildung 32).

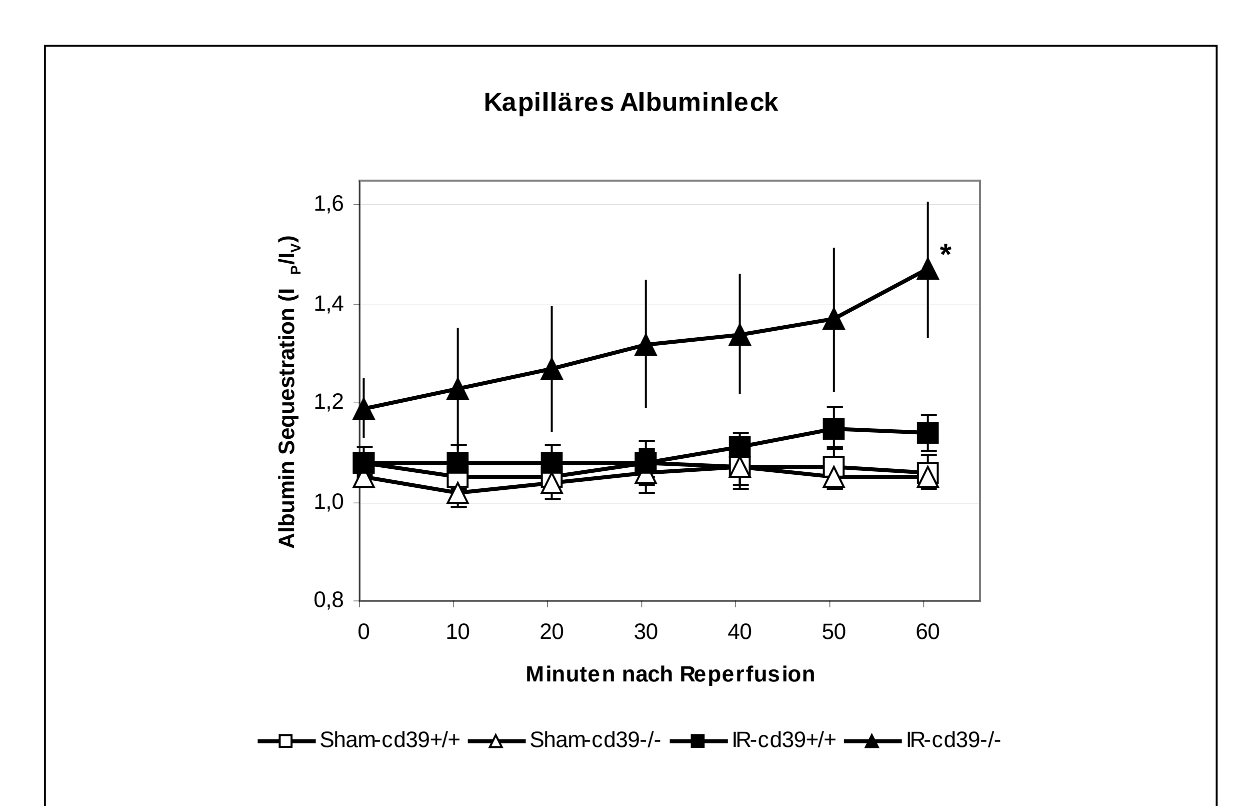


Abbildung 32: Kapillarleck nach intestinaler Ischämie. Der Quotient aus der Lichtintensität im perivaskulären Gewebe (I_P) und der benachbarten Venole (I_V) wurde als Parameter für die Sequestration fluoreszenzmarkierten Albumins bestimmt. In scheinoperierten Wildtyp- und cd39-null Mäusen (Sham-cd39+/+, Sham cd39-/-) fand sich eine vergleichbare Albumin-Anreicherung. Nach 45-minütiger intestinaler Ischämie zeigten cd39-null Mäuse (IR-cd39-/-) im Trend eine vermehrte Albumin-Sequestration im Vergleich zu den postischämen Wildtyp-Tieren (IR-cd39+/+), die nach 60 Minuten Reperfusion das Signifikanzniveau erreichte (: p=0,035). Die Wildtyp-Mäuse demonstrierten nach 45-minütiger Ischämie kein signifikantes Albuminleck.*

Unmittelbar nach Freigabe des Blutstromes nach 45-minütiger intestinaler Ischämie (IR) zeigten die *cd39*-null Tiere bei stabilem Kreislauf bereits einen Trend zu einer erhöhten Albumin-Akkumulation im perivaskulären Gewebe (p=0,078 vs. Sham $cd39^{+/+}$), während die Werte der Wildtyp-Mäuse in der gesamten Beobachtungszeit von 60 Minuten keinen Anstieg gegenüber den Kontrollen demonstrierten. Eine Stunde nach Beginn der Reperfusionsphase fand sich eine deutlich vermehrte Anreicherung des fluoreszenzmarkierten Albumins im perivaskulären Gewebe der *cd39*-null Mäuse (p=0,035 vs. IR $cd39^{+/+}$).

3.4.2 Evans Blue Farbstoff

60 Minuten nach der intravenösen Injektion der Evans Blue Lösung zeigte sich in den nichtoperierten Wildtyp- und *cd39*-null Kontrolltieren eine vergleichbare Akkumulation des Farbstoffs in den jejunalen Proben (Kontrolle, 21,6 ± 2,83 OD/g vs. 25,8 ± 1,98 OD/g, p=0,149, Abbildung 33). Die Eröffnung der Peritonealhöhle und Durchführung der Scheinoperation führte in den *cd39*-null Mäusen bereits zu einer deutlich erhöhten Anreicherung des Evans Blue Farbstoffs im Jejunum (Sham, 39,7 ± 1,84 OD/g, p=0,004 vs. Kontrolle), während die Wildtyp-Tiere unter diesen Bedingungen keine Steigerung der Gefäßpermeabilität zeigten (21,4 ± 2,34 OD/g, p=0,484 vs. Kontrolle). In der Reperfusionsphase nach einer 45-minütigen intestinalen Ischämie fand sich sowohl in den Wildtyp-Mäusen eine vermehrte Akkumulation des Farbstoffs im jejunalen Gewebe als auch eine weitere Zunahme in den *cd39*-null Mäusen (Vehikel; $cd39^{+/+}$: 44,6 ± 0,97 OD/g, p=0,002 vs. Sham; $cd39^{-/-}$: 51,7 ± 2,10 OD/g, p=0,007 vs. Sham, p=0,030 vs. $cd39^{+/+}$). Die Substitution der intravasalen NTPDase sowie die Applikation von Adenosin/Amrinon verhinderten den Anstieg der Evans Blue Akkumulation in der Reperfusionsphase nach intestinaler Ischämie in den Versuchstieren beider Genotypen. Die gemessenen Werte unterschieden sich nicht von denen der jeweiligen nichtoperierten Kontrollen ($cd39^{+/+}$: 25,4 ± 7,50 OD/g, p=0,335 NTPDase vs. Kontrolle, 24,6 ± 3,99 OD/g, p=0,285 Adenosin/Amrinon vs. Kontrolle; $cd39^{-/-}$: 25,0 ± 1,95 OD/g, p=0,397 NTPDase vs. Kontrolle, 21,1 ± 2,91 OD/g, p=0,130 Adenosin/Amrinon vs. Kontrolle).

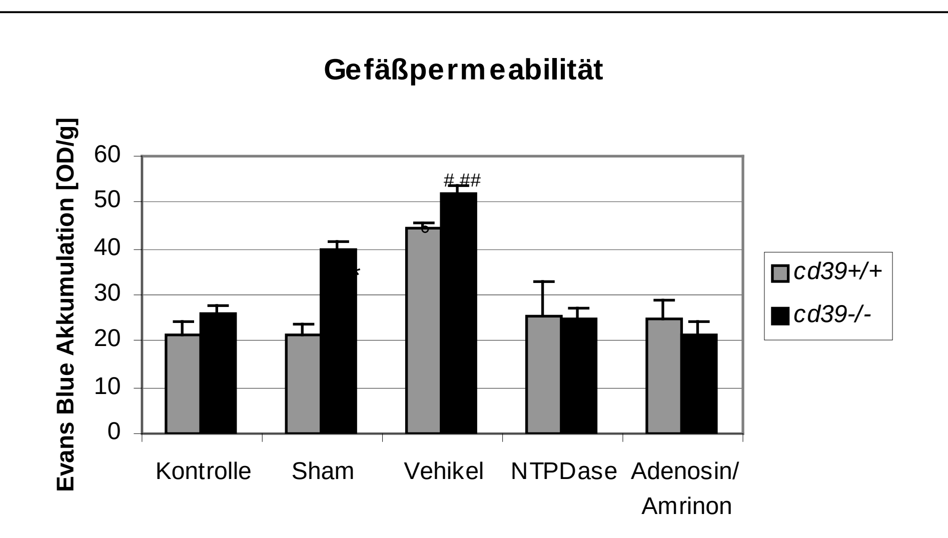


Abbildung 33: Gefäßpermeabilität nach intestinaler Ischämie. Die optische Dichte (OD) in den Extrakten der Jejunumproben nach Evans Blue Injektion wurde als Parameter für die Gefäßpermeabilität bestimmt. Die scheinoperierten cd39-null Mäuse (Sham, cd39-/-) demonstrierten bereits eine deutlich vermehrte jejunale Evans Blue Akkumulation im Vergleich zu den nichtoperierten Kontrollen (: p=0,004) sowie den scheinoperierten Wildtyp-Tieren (cd39+/+, **: p=0,002). Nach 45-minütiger intestinaler Ischämie zeigte sich in der Reperfusionsphase in beiden Genotypen eine Zunahme der Gefäßpermeabilität gegenüber den scheinoperierten Tieren (°: p=0,002, $^{\#\#}$: p=0,007). Die Evans Blue Anreicherung war in den postischämen cd39-null Mäusen signifikant höher als in den Wildtypen ($^{\#}$: p=0,030). Durch Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (NTPDase) oder Applikation von Adenosin und Amrinon wurde der postischäme Anstieg der Gefäßpermeabilität verhindert.*

3.5 SERUM- UND GEWEBEMARKER

3.5.1 Zytokine nach intestinaler Ischämie

Wildtyp-Mäuse zeigten eine Stunde nach Freigabe des Blutstromes nach einer 60-minütigen Okklusion der Arteria mesenterica superior signifikant höhere Serumkonzentrationen des IL-1α als die scheinoperierten Kontrollen (148,2 ± 38,22 pg/ml vs. 62,2 ± 4,49 pg/ml, p=0,045). Versuchstiere, die vor dem Beginn der Reperfusion mit löslicher NTPDase substituiert wurden, demonstrierten keinen Anstieg des IL-1α im Serum gegenüber den scheinoperierten Tieren (81,5 ± 17,87 pg/ml, p=0,176, Abbildung 34).

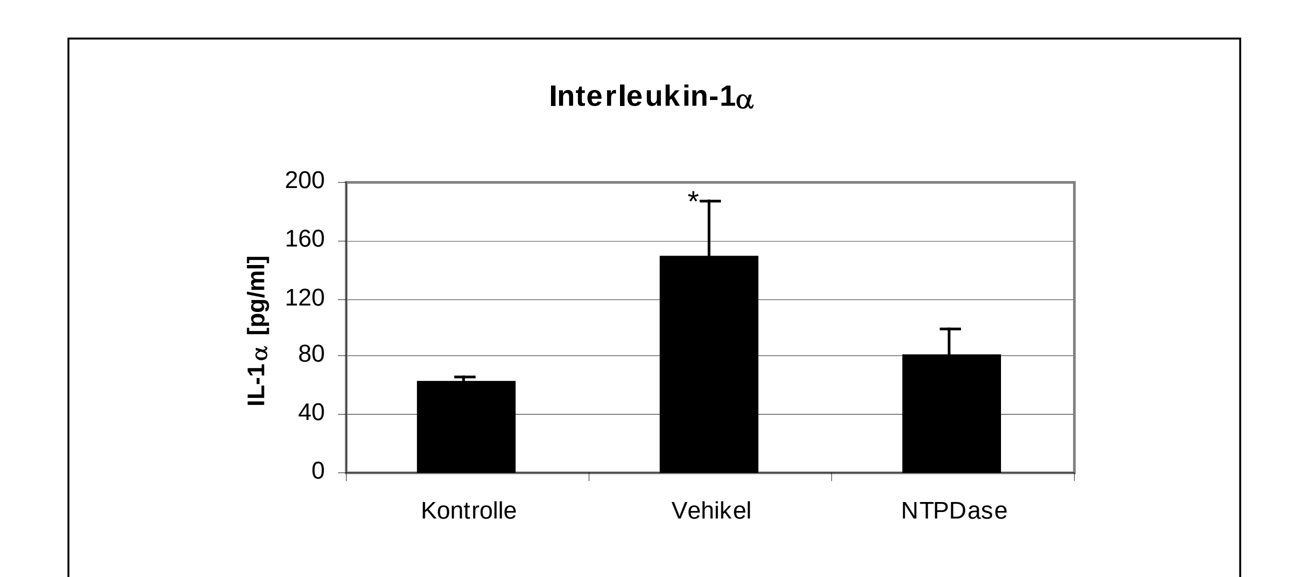
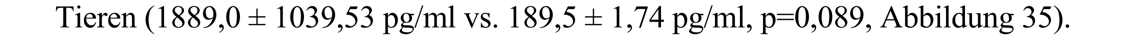


*Abbildung 34: Interleukin-1α nach intestinaler Ischämie. Wildtyp-Mäuse zeigten nach 60-minütiger intestinaler Ischämie (Vehikel) einen signifikanten Anstieg der Serumkonzentration des Interleukin-1α (IL-1α, *: p=0,045) im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen. Die Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (NTPDase) vor Freigabe der Reperfusion verhinderte die vermehrte Zytokinfreisetzung.*

Die Messwerte für das Interleukin-6 wiesen in der Gruppe der postischämen Wildtyp-Mäuse extreme Abweichungen auf und lieferten somit bei der kleinen Grundgesamtheit nur einen statistischen Trend zu erhöhten Serumkonzentrationen gegenüber den scheinoperierten



Tieren (1889,0 ± 1039,53 pg/ml vs. 189,5 ± 1,74 pg/ml, p=0,089, Abbildung 35).

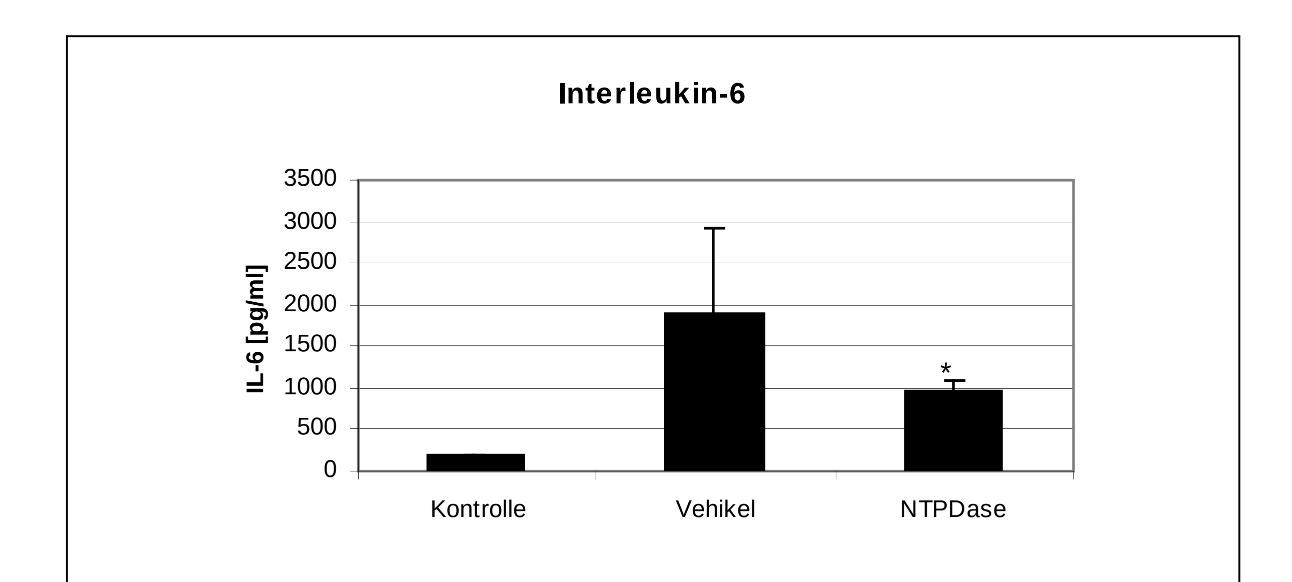


Abbildung 35: Interleukin-6 nach intestinaler Ischämie. Die Bestimmung der Serumkonzentration des Interleukin-6 (IL-6) nach 60-minütiger intestinaler Ischämie in Wildtyp-Mäusen (Vehikel) zeigte einen extremen Standardfehler, so dass sich statistisch nur ein Trend zu einer erhöhten Konzentration im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen ergab. Die Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (NTPDase) vor Freigabe der Reperfusion verhinderte die vermehrte Zytokinfreisetzung nicht vollständig (: p=0,003).*

Jeder einzelne Messwert der mit dem Vehikel behandelten Tiere lag jedoch über denen der scheinoperierten Tiere. Die Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität konnte die vermehrte postischäme Freisetzung des IL-6 im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen nicht verhindern (962,1 ± 138,88 pg/ml, p=0,003).

Die Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors-α war nach intestinaler Ischämie signifikant höher als in den scheinoperierten Kontrolltieren (125,9 ± 10,22 pg/ml vs. 61,3 ± 3,53 pg/ml, p=0,002, Abbildung 36), ein Befund, der sich für die NTPDase-substituierten Tiere nur im Trend bestätigt (96,2 ± 19,87 pg/ml, p=0,079).

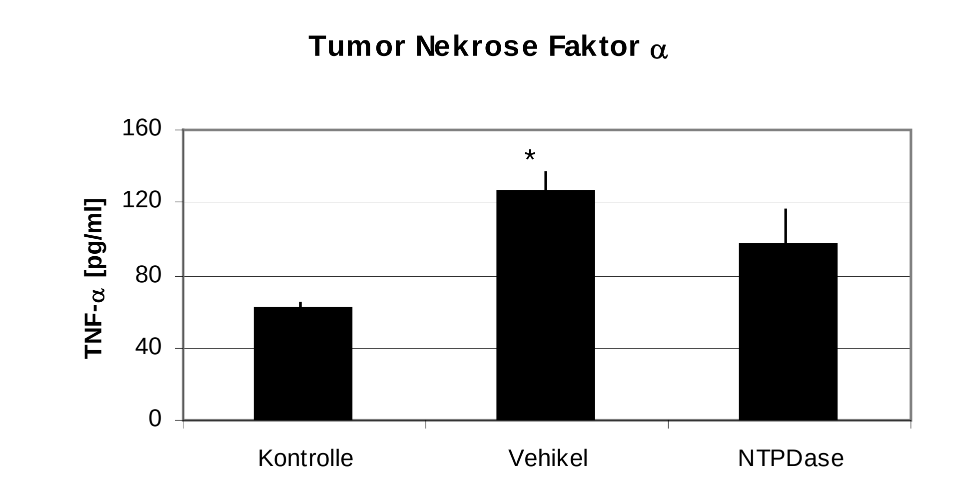


Abbildung 36: Tumor-Nekrose-Faktor-α nach intestinaler Ischämie. Die Serumkonzentration des Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) in der Reperfusionsphase nach 60-minütiger intestinaler Ischämie in Wildtyp-Mäusen (Vehikel) zeigte signifikant höhere Werte als in den scheinoperierten Kontrollen (: p=0,002). Die Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (NTPDase) vor Freigabe der Reperfusion verminderte die Zytokinfreisetzung (p=0,079 vs. Kontrolle).*

3.5.2 Myeloperoxidase-Aktivität nach intestinaler Ischämie

In der Reperfusionphase nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior zeigten die mit dem Vehikel behandelten Wildtyp-Mäuse keinen signifikanten Anstieg der MPO-Aktivität in den untersuchten Jejunum-Proben gegenüber den scheinoperierten Kontrolltieren (123,2 ± 39,31 mU/g vs. 75,1 ± 18,88 mU/g, p=0,166, Abbildung 37). Die MPO-Aktivität der mit löslicher NTPDase substituierten Tiere lag im Mittel zwischen den Werten der Kontrolltiere und der postischämen Mäuse (109,0 ± 36,26 mU/g). Trotz der fehlenden statistischen Signifikanz zum Untersuchungszeitpunkt (60 Minuten nach Freigabe der Reperfusion) zeigten die Mittelwerte der MPO-Aktivität in den postischämen Geweben eine Tendenz, die den Ergebnissen der Zytokin-Messungen entsprechen (siehe 3.5.1).

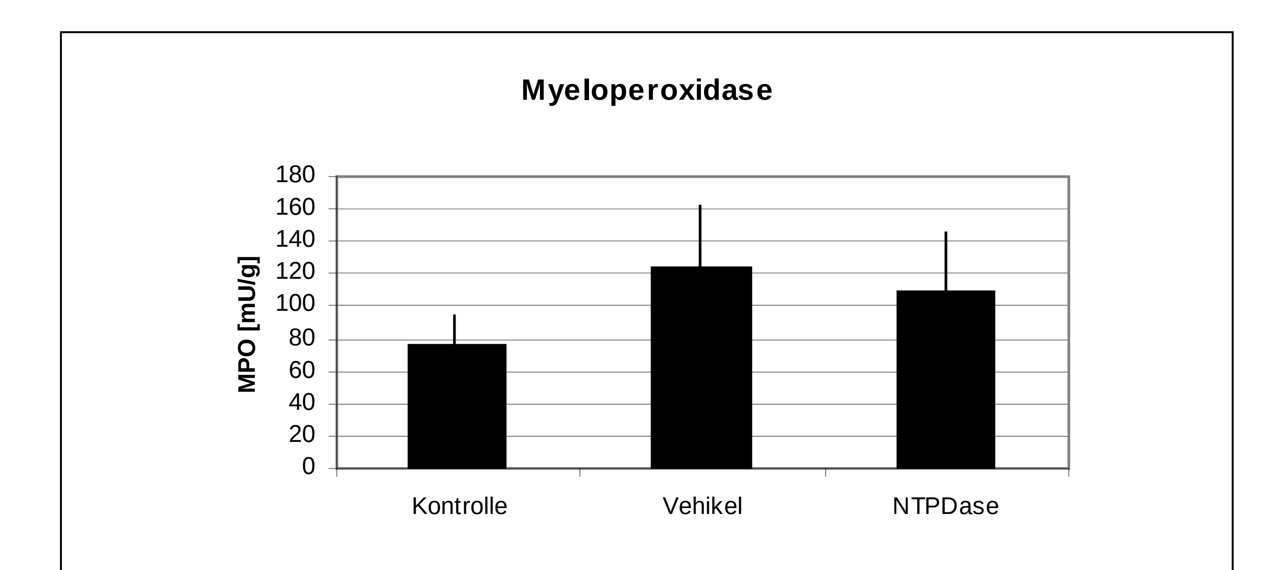


Abbildung 37: Myeloperoxidase-Aktivität nach intestinaler Ischämie. Am Ende einer einstündigen Reperfusionsphase nach 60-minütiger intestinaler Ischämie wurde die jejunale Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) bestimmt. Die Werte der unbehandelten, postischämen Wildtyp-Mäuse (Vehikel) unterschieden sich nicht signifikant von denen der scheinoperierten Kontrollen oder den Werten nach Substitution der intravasalen Nukleotidase-Aktivität (NTPDase).

3.5.3 Vascular-Endothelial-Growth-Factor

Die Serumkonzentrationen des VEGF in nativen Wildtyp- und *cd39*-null Mäusen zeigten mit 74,3 ± 2,75 pg/ml und 98,3 ± 16,75 pg/ml keine signifikante Differenz (p=0,293).

3.6 ENDOTHELZELL-AKTIVIERUNG DURCH NUKLEOTIDE

Die Stimulation der kultivierten HUVEC mit ATP oder UTP führte zu einer deutlichen Veränderung der Zellarchitektur im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Neben einer Spreizung der Zellen zeigte sich nach Färbung der Aktinfilamente in der Fluoreszenzmikroskopie deutlich die Ausbildung von sogenannten Stressfasern. Repräsentative Aufnahmen der Experimente sind in Abbildung 38 wiedergegeben.

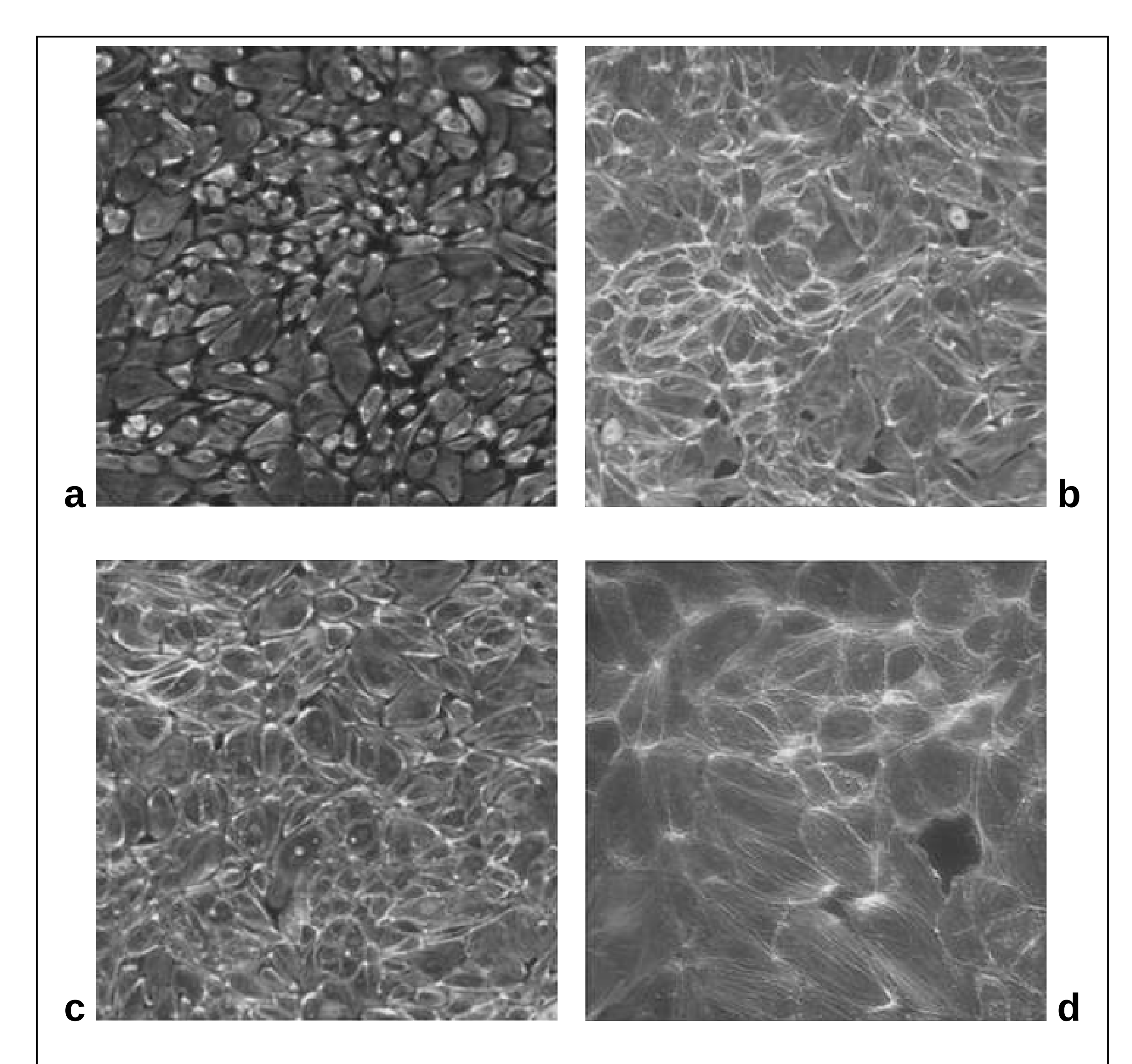


Abbildung 38: Veränderungen des Zytoskeletts durch Nukleotid-Stimulation. Fluoreszenzmiskoskopie humaner aus Umbilikalvenen isolierter Endothelzellen (HUVEC) nach Färbung der Aktinfilamente mit Alexa Fluor 488 Phalloidin. Nach Stimulation mit Adenosintriphosphat (b, Vergrößerung: 100-fach) oder Uridintriphosphat (c, Vergrößerung: 100-fach) zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (a, Vergrößerung: 100-fach) eine Zellspreizung und die Ausbildung von Stressfasern, die in d) mit einer höheren Vergrößerung wiedergegeben sind (Stimulation mit Adenosintriphosphat, Vergrößerung: 200-fach).

4 DISKUSSION

4.1 NTPDase-AKTIVITÄT IN NATIVEN ORGANEN

Den biologischen Funktionen der Organe entsprechend weist die gesamte Nukleotidase-Aktivität ebenso wie der Anteil der NTPDase 1 an der Gesamtaktivität eine erhebliche Variabilität auf. Die höchsten Aktivitäten finden sich in der Lunge mit einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust nach *cd39*-Deletion und im Herzen, dessen Gesamtaktivität durch den cd39-Mangel nicht beeinflusst wird. Mehr als die Hälfte der Nukleotidase-Aktivität der Leber entfällt auf die alkalische Phosphatase, während die NTPDase 1 quantitativ keine Relevanz aufweist. Im Pankreas und Jejunum hingegen entfällt die Hälfte der Nukleotidase-Aktivität auf die NTPDase 1.

Die biologische Bedeutung der NTPDase 1 ergibt sich jedoch nicht aus dem quantitativen Anteil an der globalen Nukleotidase-Aktivität des Organs, als vielmehr aus den variierenden pharmakologischen Eigenschaften der NTPDasen und deren bevorzugter Lokalisation in den verschiedenen Kompartimenten der Organsysteme [Sevigny et al., 2002]. Die NTPDase 1 hydrolisiert die Substrate ATP und ADP ohne Zwischenschritt zu AMP und wird in immunhistologischen Färbungen vorwiegend auf dem Endothel größerer und kleinerer vaskulärer Strukturen lokalisiert. Die NTPDase 2 hingegen ist vorwiegend eine Nukleosid-Triphosphatase, liefert als Produkt ADP und wird in der Adventitia und auf Perizyten exprimiert. Die unterschiedliche biochemische Aktivität dieser beiden NTPDasen und die Lokalisation in verschiedenen Kompartimenten des Gefäßsystems hat erhebliche Bedeutung für die Thromboregulation. Das intakte Endothel erhält mit seiner NTPDase 1 eine antithrombotische Gefäßoberfläche. Nach Störung der Oberflächenintegrität führt die Freisetzung von ATP aus geschädigten Zellen oder aus den elektronendichten Granula aktivierter Thrombozyten durch die Aktivität der NTPDase 2 zu einer lokal erhöhten ADP-Konzentration. ADP ist ein potenter Agonist der $P2Y_1$- und $P2Y_{12}$-Rezeptoren der Thrombozyten und stimuliert die Thrombozytenaggregation. Es ensteht ein prothrombotisches Milieu.

Neben der Lokalisation im Gefäßsystem finden sich auch in den spezifischen Kompartimenten der Organe signifikante NTPDase-Aktivitäten, die mit den verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen und Funktionszuständen in Verbindung gebracht werden. Die Azini des exokrinen Pankreas der Maus zeigten eine kräftige, dem Lumen zugewandte Expression der NTPDase 1, während sich basolateral und auf den duktalen Epithelzellen eine überwiegende Expression der NTPDase 2 fand [Kittel et al., 2004]. Dieses Verteilungsmuster weist jedoch eine erhebliche Speziesvariabilität und inkonstante Ausprägung auf, die im Zusammenhang mit den variierenden biologischen Funktionen des exokrinen Pankreas interpretiert wird [LeBel et al., 1980; Sevigny et al., 1998; Beaudoin et al., 1999; Kittel et al., 2002; Kittel et al., 2004]. Die Inselzellen des humanen Pankreas zeigen ebenfalls eine signifikante NTPDase-Aktivität [Kittel et al., 2002] und der cd39-Mangel in den *cd39*-null Mäusen führt zu einer diabetischen Stoffwechsellage (S.C. Robson, persönliche Kommunikation). Das Verteilungsmuster der purinergen P2X- und P2Y-Rezeptoren korreliert mit den oben beschriebenen Befunden und adaptiert sich unter pathophysiologischen Bedingungen [Coutinho-Silva et al., 2003]. Extrazelluläre Nukleotide führten sowohl zu einer verstärkten Insulinsekretion der β-Zellen [Fernandez-Alvarez et al., 2001] als auch zu einer gesteigerten Chloridsekretion der duktalen Epithelzellen [Nguyen et al., 2001].

In der Leber des Hausschweins zeigen sich sowohl die Endothelzellen als auch die Hepatozyten und Gallengangsepithelien positiv für die NTPDase 1 [Leclerc et al., 2000]. In der Ratte hingegen beschränkt sich der Nachweis der NTPDase 1 auf die vaskulären Strukturen, während die NTPDase 2 in der Umgebung der intrahepatischen Gallengänge auf portalen Fibroblasten exprimiert wird, die möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Enstehung einer Gallengangssklerose haben [Dranoff et al., 2002]. In isolierten hepatischen Sternzellen zeigte sich eine konstante Expression der NTPDase 1, während die NTPDase 2 nur im aktivierten Zustand nachgewiesen werden konnte, der mit einem veränderten Expressionsmuster der purinergen P2Y-Rezeptoren einherging und Bedeutung bei der Fibrosebildung erlangt [Dranoff et al., 2004a; Dranoff et al., 2004b]. Des weiteren wurde in der Leber verschiedener Spezies eine weitere, neue NTPDase geklont und nachgewiesen (NTPDase 8), die ebenfalls als Protein der Zelloberfläche imponiert und extrazelluläre

Nukleotide hydrolisiert [Bigonnesse et al., 2004; Knowles,Li, 2006]. Die physiologische Bedeutung und Lokalisation in der Leber verbleibt zunächst unklar. Die Gallengangsepithelien zeigen eine variable Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren und ihre Stimulation reguliert die Gallesekretion der Leber [Dranoff et al., 2001].

Der immunhistologische Nachweis der NTPDasen 1 und 2 in murinen Herzen beschränkt sich auf die vaskulären Strukturen und das Endokard, mit der oben beschriebenen Kompartimentierung [Sevigny et al., 2002]. Neben dem beschriebenen Einfluss auf die Thromboregulation wird der Expression der NTPDase 1 auf der glatten Muskulatur der größeren Gefäße eine Bedeutung in der Regulation des Gefäßtonus zugeschrieben. Die vasomotorischen Eigenschaften der glatten Muskelzellen werden im Wesentlichen durch $P2X_1$-Rezeptoren gesteuert und durch die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren moduliert [Erlinge et al., 1998]. Die Stimulation der P2Y-Rezeptoren induzieren darüber hinaus eine Proliferation der glatten Muskulatur [Hou et al., 2000]. Eine regulierende Rolle der NTPDase 1 kann in diesem Zusammenhang postuliert werden. Patienten mit einer chronischen (ischämischen) Herzerkrankung zeigen als Zeichen der veränderten pathophysiologischen Bedingungen neben dem Nachweis der NTPDase 1 auch auf Kardiomyozyten [Kittel et al., 2005] zusätzlich ein verändertes Expressionsmuster der myokardialen P2-Rezeptoren [Banfi et al., 2005]. Der quantitativ größte Anteil der NTPDase-Aktivität des Herzens wird der NTPDase 6 (CD39L2) zugeschrieben, deren Genprodukt ausschließlich im Herz und fetalen Gehirn nachweisbar war [Yeung et al., 2000]. Die messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) der NTPDase 6 wurde in kapillären Endothelzellen und Kardiomyozyten lokalisiert und das bevorzugte Substrat der NTPDase 6 ist ADP.

Systematische Untersuchungen zur Expression und Funktion von NTPDasen im Gastrointestinaltrakt liegen bisher nur unvollständig vor. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass rund 60% der Aktivität auf die NTPDase 1 entfällt. Neben dem Nachweis der endothelialen NTPDase-Aktivität im mesenterialen Stromgebiet [Duval et al., 2003], konnte CD39/NTPDase 1 ebenso als Antigen auf Enterozyten identifiziert werden [Martin-Villa et al., 1997]. Der epithelialen NTPDase-Aktivität wurde eine physiologische Rolle bei der Degradation von Nahrungs-Nukleotiden zugeordnet [Schweickhardt et al., 1995]. Neuere

Untersuchungen zeigten unter hypoxischen Bedingungen einen erheblich gesteigerten epithelialen *cd39*-mRNA-Nachweis, der mit einer vermehrten Permeabilität des Epithels einhergeht [Synnestvedt et al., 2002]. Eine signifikante NTPDase-Aktivität fand sich darüber hinaus in den intestinalen Lymphstrukturen [Benrezzak et al., 1999]. Die enteralen Gliazellen waren positiv für die NTPDase 2 [Braun et al., 2004]. Entsprechend lassen sich P2-Rezeptoren in den vaskulären Strukturen und der glatten Muskulatur des Intestinums nachweisen, die den Gefäßtonus und die Darmmotilität regulieren [Giaroni et al., 2002]. Die Aktivierung der purinergen Rezeptoren des Epitheliums beeinflusst die Kalium-, Bikarbonat- und Chlorid-Sekretion und hemmt die Natrium-Rückresorption [Bucheimer,Linden, 2004].

Die Lokalisation der Ekto-Nukleotidasen in der Niere und insbesondere ihre variierende Verteilung entlang der verschiedenen Abschnitte des Nephrons wurde kürzlich ausführlich dargestellt [Vekaria et al., 2006]. Es fand sich eine Koexpression mit den verschiedenen Adenosin- und P2-Rezeptoren. Die biologischen Wirkungen dieses komplexen Verteilungsmusters verbleiben jedoch zunächst unklar.

4.2 NTPDase-AKTIVITÄT BEI AKUTEN ORGANSCHÄDEN

Nach warmer intestinaler Ischämie zeigen die Proteinpräparationen der Jejunumsegmente keinen messbaren Abfall der NTPDase-Aktivität. Die mesenterialen Präparate mit einem hohen Anteil vaskulärer Strukturen hingegen demonstrieren zum Zeitpunkt der Freigabe des Blutstromes nach 60-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior eine signifikante Verminderung der NTPDase-Aktivität. Innerhalb einer Stunde nach Reperfusion findet sich eine vollständige Rekonstitution. Im Modell der xenogenen Herztransplantation mit einer einstündigen kalten Ischämie zeigt sich eine prolongierte Rekonstitutionsphase. Nach einem signifikanten Abfall der globalen NTPDase-Aktivität des Herzens unmittelbar nach Freigabe des Blutstromes bleibt dieser für mehr als 24 Stunden im Akkommodationsmodell bestehen. Im Rejektionsmodell findet sich bis zum Zeitpunkt des Organverlustes keine Zunahme der

Aktivität. Im Modell der akuten toxischen Hepatitis wird die erwartete Verminderung der globalen hepatischen NTPDase-Aktivität 24 Stunden nach Injektion des Lipopolysaccharids nachgewiesen. Bei den überlebenden Tieren zeigt sich 48 Stunden nach der Injektion eine Regeneration der Enzymaktivität.

Der Verlust der vaskulären NTPDase-Aktivität in Ischämie-Reperfusions- und Transplantationsmodellen wurde bereits mehrfach demonstriert [Candinas et al., 1996; Koyamada et al., 1996; Robson et al., 1997; Robson et al., 1999]. Mit den hier vorgestellten Daten kann jedoch erstmals der Verlust der Aktivität unmittelbar nach der Ischämiephase und der Zeitverlauf der Rekonstitution in Abhängigkeit vom Ausmaß der Schädigung belegt werden. In vorhergehenden immunhistologischen Untersuchungen zeigte sich nach Ischämie-Reperfusion kein vollständiger Verlust der endothelialen cd39-Expression. Die verminderte NTPDase-Aktivität wurde vielmehr als Folge einer Konformationsänderung des Proteins angesehen. Im Modell der xenogenen Herztransplantation jedoch folgte die Rekonstitution der NTPDase-Aktivität dem Nachweis einer gesteigerten *cd39*-mRNA-Transkription [Imai et al., 1999c].

Als Folge der verminderten cd39-Aktivität des postischämen Gefäßendothels kann eine lokal erhöhte ATP- und ADP-Konzentration postuliert werden, die ein prothrombotisches und proinflammatorisches Milieu entstehen lässt. Primär durch das Ischämie-Trauma oder sekundär durch freie Nukleotide aktivierte Thrombozyten setzen einerseits weitere Adenosinnukleotide frei und unterhalten das prothrombotische Milieu (siehe 1.3.1 und 1.3.2), andererseits aktivieren sie das Komplementsystem [Del Conde et al., 2005]. Die Ausbildung von Mikrothromben wurde außerdem als Promoter der Monozytenrekrutierung beschrieben [Mause et al., 2005]. Insgesamt wurden aktivierte Thrombozyten bereits früher als Mitinitiator einer postischämen Entzündungsreaktion angesehen [Massberg et al., 1998; Massberg et al., 1999; Salter et al., 2001]. Weiterhin kann in den vorgestellten Experimenten *in vitro* eine direkt durch Nukleotide induzierte Endothelzell-Aktivierung mit einer entsprechenden Veränderung des Zytoskeletts nachgewiesen werden (siehe 3.6), die durch P2Y-Rezeptoren vermittelt wird [Kaczmarek et al., 2005]. Ähnliche Experimente mit einer gezielten Stimulation der P2-Rezeptoren in kultivierten HUVEC führten zu einer Zellschrumpfung, die als Ursache für eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität angesehen

wurde [Tanaka et al., 2004]. Somit kommt der vaskulären NTPDase-Aktivität eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens zu.

Neben den beschriebenen Auswirkungen der erhöhten ATP- und ADP-Konzentrationen, kann durch den postischämen Verlust der NTPDase-Aktivität zusätzlich ein vermindertes Substratangebot für die 5'-NT erwartet und somit eine verminderte endogene Adenosingeneration postuliert werden. Adenosin selbst antagonisiert, insbesondere durch die Stimulation der A_{2A}-Rezeptoren, eine Vielzahl der Wirkungen der Adenosinnukleotide und wird als antiinflammatorisches Agens angesehen [Sullivan, 2003]. Adenosin hemmt die Thrombozytenaggregation, inhibiert die Leukozytenaktivierung und wirkt endothelzellprotektiv. Der vaskuläre NTPDase-Mangel vermag somit den Ischämie-Reperfusionsschaden durch den Erhalt eines prothrombotischen und proinflammatorischen Milieus (ATP, ADP) sowie durch Hemmung antiinflammatorischer Effekte (Adenosin) zu verstärken.

Im Gegensatz zur NTPDase 1 wurde die Expression und Aktivität der 5'-NT (cd73) durch akuten oxidativen Stress induziert [Chen et al., 2001]. Eine chronische Hypoxie hingegen führte *in vitro* sowohl zu einer vermehrten Aktivität der 5'-NT als auch zu einer Induktion der NTPDase 1 in kultivierten Endothelzellen [Eltzschig et al., 2003; Li et al., 2006].

Ausreichende Daten zur Bewertung der Rolle der Nukleotidasen und der purinergen Metabolite im Modell der akuten toxischen Hepatitis liegen derzeit nicht vor. In den vorliegenden Experimenten haben wir eine Verminderung der globalen NTPDase-Aktivität 24 Stunden nach Lipopolysaccharid-Injektion nachgewiesen. Die Applikation eines selektiven A_{2A}-Rezeptor-Agonisten führte in einem vergleichbaren Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion sowohl der TNF-α-Produktion als auch der Letalität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen [Odashima et al., 2005]. Andererseits führte die 5-fach vermehrte CD39-Expression nach adenoviralem Gentransfer in Hepatozyten und Sinusoidalzellen zu einer erhöhten Letalität nach LPS-induzierter Hepatitis im Vergleich zu den vektorinfizierten oder unbehandelten Kontrolltieren [Imai et al., 1999a].

Allerdings bedingte die erhebliche Überexpression der NTPDase 1 in den infizierten Mäusen eine signifikante Reduktion der ATP-Plasmakonzentration, so dass die erhöhte Letalität möglicherweise vorrangig durch eine Energiedepletion bedingt sein könnte (M. Imai und O. Guckelberger, unveröffentlichte Daten).

4.3 BEDEUTUNG DER NTPDase 1 FÜR DIE HEPATISCHE ISCHÄMIETOLERANZ

Die in den Wildtyp-Mäusen mit einer niedrigen Letalität einhergehende, 45-minütige hepatische Ischämie führt in Tieren mit einem cd39-Mangel zu einer signifikanten Mortalität. Die Substitution mit Adenosin/Amrinon oder löslicher NTPDase in der Reperfusionsphase verbessert die Überlebensraten der heterozygoten Mäuse signifikant. Die Expression des protektiven Gens A20 führt zu einer verlängerten Überlebenszeit, ohne jedoch ein Langzeitüberleben erreichen zu können.

Eine systematische Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen während der Leberreperfusion zeigte mit Verlängerung der Ischämiezeit eine Zunahme der mit dem Endothel interagierenden Thrombozyten, die linear mit der Störung der sinusoidalen Perfusion korrelierte [Khandoga et al., 2003]. Die hier vorgestellten Daten zeigen ebenfalls eine sinusoidale Stauung bei den postischämen Wildtyp-Mäusen mit einer Überlebensrate von 92 %. Die *cd39*-null oder *cd39*-heterozygoten Tiere demonstrieren eine deutlich verminderte Ischämietoleranz. In den *cd39*-null Tieren formieren sich bei fehlender vaskulärer NTPDase-Aktivität segmentale Thrombosen der venösen Abflussgebiete mit einer Letalität von 92 %. Die Mortalität der *cd39*-heterozygoten Tiere beträgt 68 %, die sich unter der Substitution mit löslicher NTPDase auf 33 % reduziert. Der cd39-Mangel lässt sich durch die Supplementation in der Reperfusionsphase kompensieren.

Adenosin, das Endprodukt des extrazellulären purinergen Stoffwechsels durch die Nukleotidasen, wurde als bedeutender Mediator der hepatischen Präkonditionierung

identifiziert [Serracino-Inglott et al., 2002; Carini,Albano, 2003; Koti et al., 2003; Teoh,Farrell, 2003]. Durch die Exposition gegenüber einer kurzfristigen hepatischen Ischämie wird eine erhöhte Ischämietoleranz der Leber induziert (ischämische Präkonditionierung, IPC). Dieser Effekt kann ebenfalls durch verschiedene chemische Substanzen erreicht werden (pharmakologische Präkonditionierung). Die detailliertesten Daten liegen für die Applikation von Adenosin oder selektiven A_{2A}-Rezeptor-Agonisten vor [Harada et al., 2000; Ben-Ari et al., 2005]. Die pharmakologische Präkonditionierung erfolgt vor Induktion der hepatischen Ischämie. In den vorgestellten Experimenten zeigt die Substitution mit Adenosin/Amrinon während der Reperfusionsphase den gleichen Effekt wie die Supplementation der NTPDase-Aktivität in den *cd39*-heterozygoten Mäusen (33 % Mortalität). Auch für Wildtyp-Tiere konnte ein Nutzen der A_{2A}-Rezeptor-Stimulation in der Reperfusionsphase nach hepatischer Ischämie gezeigt werden [Day et al., 2004]. Eine verzögerte Applikation bis zu einer Stunde nach Freigabe des Blutstromes war ebenfalls noch hepatoprotektiv wirksam.

Die NTPDase 1 stellt einen essentiellen Faktor für die Ischämietoleranz der Leber dar, deren pathophysiologische Bedeutung sich insbesondere in der frühen Phase der Reperfusion manifestiert. Im Rahmen der hepatischen Ischämietoleranz stellt die Generierung des AMP einen bedeutsamen Teil der Wirkung der vaskulären NTPDase dar. Das AMP ist als Substrat der 5'-NT eine signifikante, endogene Quelle des hepatoprotektiven Adenosins. Das protektive Gen A20 kompensiert den NTPDase 1-Mangel nur teilweise.

4.4 BEDEUTUNG DER VASKULÄREN NTPDase FÜR DEN INTESTINALEN ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN

4.4.1 Ischämietoleranz

Die 60-minütige intestinale Ischämie ist in nativen Wildtyp-, *cd39*-null und *cd39*-heterozygoten Mäusen mit einer hohen Letalität verbunden. Die einmalige Substitution mit

löslicher NTPDase vor Freigabe des Blutstromes führt bei den Wildtyp-Versuchstieren zu einer Ischämietoleranz, mit dem Erhalt der vaskulären und mukosalen Integrität in den jejunalen Histologien. Die Mäuse mit einem cd39-Mangel hingegen profitieren nicht signifikant von der NTPDase-Supplementation. Die Applikation von Adenosin/Amrinon führt in dem Modell des ausgeprägten intestinalen Ischämie-Reperfusionsschadens sowohl bei den Wildtypen als auch bei den cd39-defizienten Mäusen zu keiner Verbesserung der Überlebensraten [Guckelberger et al., 2004].

In der Frühphase nach Reperfusion einer Dünndarmischämie konnte die Beteiligung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen an den pathophysiologischen Prozessen experimentell nachgewiesen [Massberg et al., 1998; Massberg et al., 1999] und eine postischäme Dysfunktion der frei zirkulierenden Thrombozyten, im Sinne einer Verbrauchskoagulopathie, gezeigt werden [Aydemir-Koksoy et al., 1999]. Dementsprechend kann der protektive Effekt der löslichen NTPDase bei Wildtyp-Mäusen in dem vorgestellten Modell der intestinalen Ischämie durch die Elimination des ADP als antithrombogene Wirkung interpretiert werden. In den cd39-defizienten Tieren muss durch die NTPDase-Substitution hingegen mit einer Resensibilisierung der Thrombozyten und einem Rebound-Phänomen gerechnet werden [Robson et al., 2000]. Die reaktive Hyperaktivität der Thrombozyten könnte den fehlenden protektiven Effekt und die pulmonalen Infarkte bei diesen Tieren erklären.

Auch für den Dünndarm wurde das Konzept der ischämischen Präkonditionierung mit wechselnden Protokollen angewendet und mit einer Vielzahl von Mediatoren assoziiert [Mallick et al., 2004]. Die pharmakologische Präkonditionierung mit Adenosin zeigte einen mit der IPC vergleichbaren protektiven Effekt [Unal et al., 2003], während die Applikation eines A_1-Rezeptor-Antagonisten die Induktion der Ischämietoleranz durch die IPC verhinderte [Davis et al., 1999]. Die alleinige Supplementation mit Adenosin/Amrinon in der Reperfusionsphase führt in unserem Modell der intestinalen Ischämie zu keiner signifikanten Steigerung der Ischämietoleranz.

Der deutliche Überlebensvorteil der mit löslicher NTPDase behandelten Wildtyp-Mäuse kann als Folge der dualen Wirkung (ADP-Elimination und endogene Adenosin-Generation)

angesehen werden und geht mit einer verminderten postischämen Zytokinfreisetzung (TNF-α und IL-1α) im Vergleich zu den Kontrollen einher. Die postischämen Konzentrationen von TNF-α und IL-1α werden als Parameter sowohl für den oxidativen Stress im Gewebe als auch für die Aktivierung des Komplementsystems angesehen [Cerqueira et al., 2005].

Die Infiltration des postischämen Intestinums mit neutrophilen Granulozyten (PMN) verursacht durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme, die Produktion freier Radikale und die Störung der Mikrozirkulation einen erheblichen Gewebeschaden [Mallick et al., 2004]. Die Emigration der PMN aus den postkapillären Venolen stellt einen komplexen dreistufigen Prozess dar („rolling, adhesion, and extravasation“), der verschiedene Adhäsionsmoleküle, Chemoattractants, Chemokine und Integrine involviert. Die Infiltration des Gewebes wird indirekt durch die Myeloperoxidase-Aktivität bestimmt. Zu dem von uns ausgewerteten frühen Zeitpunkt (60 Minuten nach Freigabe des Blutstromes) zeigt sich weder bei den nativen noch bei den NTPDase-behandelten Wildtyp-Mäusen ein signifikanter Anstieg der jejunalen MPO-Aktivität.

4.4.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

Bereits in den ersten Minuten der Reperfusion nach einer 60-minütigen Okklusion der Arteria mesenterica superior zeigt sich bei den Wildtyp-Mäusen eine signifikante Zunahme der in den postkapillären Venolen adhärenten Thrombozyten im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen. Durch die einmalige Substitution der intravasalen NTPDase-Aktivität vor Freigabe des Blutstromes kann dieser Anstieg vollständig verhindert werden.

Die Adhäsion der Thrombozyten am Endothel erfolgt direkt durch Ligand-Rezeptor-Bindung oder indirekt durch Leukozyten-Vermittlung [Massberg et al., 1999; Cooper et al., 2004] und wird im Wesentlichen durch P-Selectin initiiert, das sowohl von aktivierten Thrombozyten als auch aktivierten Endothelzellen exprimiert wird [Massberg et al., 1998; Vandendries et al., 2004]. Für die Interaktionen der Thrombozyten mit der Gefäßwand während der intestinalen Reperfusion wurden zwei Phasen beschrieben, die zeitlich mit einer gesteigerten Expression von P-Selectin korrelieren [Cooper et al., 2003]. In der frühen Phase,

Minuten nach Freigabe des Blutstromes, werden präformierte Adhäsionsmoleküle aus den Weibel-Palade-Körpern an der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert [Eppihimer et al., 1997]. Fünf Stunden nach Reperfusionsbeginn zeigte sich ein erneuter Anstieg der P-Selectin-Expression, dem ein vermehrter mRNA-Nachweis voranging. Die irreversible Bindung der Thrombozyten an die Endothelzellen wurde als fibrinogenassoziiert beschrieben [Massberg et al., 1999]. Neben der Störung der Mikrozirkulation durch die Thrombogenese, fördern aktivierte und adhärente Thrombozyten die Gewebeinfiltration mit neutrophilen Granulozyten und werden somit als früher Mediator des Reperfusionsschadens angesehen [Kirton,Nash, 2000; Cooper et al., 2003; Vandendries et al., 2004].

Die Substitution der intravasalen NTPDase-Aktivität unmittelbar vor Beginn der Reperfusion des ischämen Intestinums kann in unseren Experimenten die frühe Phase der Thrombozyten-Adhäsion zuverlässig verhindern. Dabei dürfte sowohl die verminderte Thrombozyten- als auch die verminderte Endothelzellaktivierung von pathogenetischer Bedeutung sein.

4.4.3 Vaskuläre Permeabilität

Bereits eine moderate intestinale Ischämie führt in der ersten Stunde nach Freigabe des Blutstromes zu einem signifikanten Anstieg der Gefäßpermeabilität. Dieser Anstieg ist in *cd39*-null Mäusen bereits nach Durchführung einer Scheinoperation evident und nach Okklusion der Arteria mesenterica superior signifikant stärker ausgeprägt als in den Wildtyp-Tieren. Die erhöhte vaskuläre Permeabilität kann in beiden Genotypen durch die Substitution mit löslicher NTPDase oder Adenosin/Amrinon verhindert werden. Die Serumkonzentrationen des VEGF, das einen potenten Stimulus für die Gefäßpermeabilität darstellt [Josko et al., 2000], sind in nativen Mäusen beider Genotypen vergleichbar.

Die Aktivierung von Endothelzellen durch mechanische oder chemische Reize führt unter Beteiligung einer Vielzahl von Signalwegen zu einer Verminderung ihrer Barrierefunktion für Makromoleküle [Wu, 2005; Mehta,Malik, 2006]. *In vitro* führte ADP als Agonist der $P2Y_1$-Rezeptoren zu einer Kontraktion von kultivierten Endothelzellen [Tanaka et al., 2004]

und die hier vorgestellten Daten beschreiben nach Stimulation mit ATP ebenfalls eine Änderung der Zellarchitektur. Die Substitution mit löslicher NTPDase kann somit durch Elimination der Nukleotide ATP und ADP das postischäme Kapillarleck vermindern.

Außerdem konnten sowohl Adenosin als auch Adenosin-Rezeptor-Agonisten *in vitro* eine Verminderung der vaskulären Permeabilität induzieren [Wang et al., 2005]. *In-vivo*-Experimente zeigten darüber hinaus eine wirksame Verminderung des Kapillarlecks unter Hypoxie-Bedingungen durch die Aktivität der 5'-NT (cd73), deren Wirkung der Generierung von endogenem Adenosin zugeschrieben und durch Adenosin-Rezeptor-Agonisten in *cd73*-null Mäusen teilweise kompensiert wurde [Thompson et al., 2004]. Durch die Hydrolyse der Adenosinnukleotide ATP und ADP zu AMP stellt die NTPDase im postischämen Gefäßbett zusätzlich das Substrat für die Generation von endogenem Adenosin bereit und kann auch über diesen Mechanismus die vaskuläre Permeabilität vermindern.

Neben Adenosin zeigte auch die alleinige Applikation eines selektiven Phosphodiesterase-III-Inhibitors eine Verminderung der Ischämie-Reperfusion induzierten Gefäßpermeabilität [Mizutani et al., 2005], was möglicherweise die potente Wirkung der in unseren Experimenten verwendeten Adenosin/Amrinon-Kombination erklärt.

4.5 RESÜMEE UND AUSBLICK

Im Rahmen der experimentellen, warmen hepatischen oder intestinalen Ischämie stellt die vaskuläre NTPDase 1 (cd39) einen bedeutenden Faktor für die Ischämietoleranz der murinen Organe dar, der in cd39-defizienten Versuchstieren durch die Substitution mit löslicher NTPDase teilweise kompensiert werden kann. In der frühen Reperfusionsphase des Intestinums zeigt sich in den vaskulären Strukturen der Wildtyp-Mäuse ein signifikanter Abfall der NTPDase-Aktivität, die innerhalb von 60 Minuten eine vollständige Rekonstitution erfährt. In dem Transplantationsmodell mit einem zusätzlichen

Konservierungsschaden und fortgesetzten immunologischen Insulten zeigt sich eine erheblich verzögerte Rekonstitution der NTPDase-Aktivität. In dem Modell der intestinalen Ischämie in Wildtyp-Mäusen kann die einmalige Substitution mit einer löslichen NTPDase vor Freigabe des Blutstromes einen nahezu vollständigen Erhalt der vaskulären und mukosalen Integrität erreichen und das Überleben der Tiere signifikant verbessern. Die NTPDase-Substitution verhindert in diesem Modell die frühe Phase der gesteigerten Thrombozyten-Adhäsion an das postischäme Endothel und geht mit einer deutlich reduzierten vaskulären Permeabilität einher. Als Ausdruck des verminderten Ischämie-Reperfusionsschadens finden sich 60 Minuten nach Freigabe des Blutstromes keine signifikant erhöhten Serumkonzentrationen der Zytokine TNF-α und IL-1α in der Gruppe der NTPDase-substituierten Wildtyp-Tiere.

Für die beschriebenen protektiven Eigenschaften der NTPDase postulieren wir einen dualen Wirkmechanismus. Einerseits führt die Hydrolyse der intravasalen Nukleotide ATP und ADP zu einer verminderten Stimulation der prothrombotischen und proinflammatorischen purinergen Rezeptoren der Thrombozyten und Endothelzellen. Andererseits ist das Produkt der ATP- und ADP-Hydrolyse (AMP) gleichzeitig das Substrat der 5'-NT mit dem Endprodukt Adenosin. Das endogene Adenosin wirkt über die Stimulation der Adenosin-Rezeptoren antiaggregatorisch und antiinflammatorisch.

Die Stimulation der Adenosin-Rezeptoren durch endogenes Adenosin (ischämische Präkonditionierung) oder selektive Agonisten (chemische Präkonditionierung) ist als Strategie zur Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschaden bereits fest etabliert [Riksen et al., 2004a; Riksen et al., 2004b]. Die Blockierung der proaggregatorischen Wirkung des ADP durch Clopidrogel ($P2Y_{12}$-Antagonist) hat sich in einem Modell der Extremitätenischämie ebenfalls als wirksam erwiesen [Kanko et al., 2005].

Zur pharmakologischen Anwendung der NTPDase wurde zunächst eine rekombinante, wasserlösliche Form des CD39 konstruiert (solCD39) [Gayle et al., 1998] und erfolgreich in einem murinen Schlaganfallmodell eingesetzt [Pinsky et al., 2002]. Zur Konservierung der hohen biologischen Nukleotidase-Aktivität der membrangebundenen, natürlichen Form des CD39 wurde in einem neuen Ansatz CD39 in Liposomen rekonstituiert und die Funktion in

einem Thromboemboliemodell überprüft [Haller et al., 2006].

Außer in den zitierten Ischämie-Reperfusions- und Transplantationsmodellen wurden weitere potentielle pharmakologische Applikationen der intravasalen NTPDase-Substitution diskutiert [Marcus et al., 2005; Robson et al., 2005; B. Atkinson et al., 2006]. In einem Schlaganfallmodell mit verzögerter Substitution der vaskulären NTPDase (drei Stunden nach Induktion der cerebralen Ischämie) war das Infarktvolumen signifikant reduziert [Pinsky et al., 2002]. Neben der Reduktion des Infarktvolumens wurde weiterhin ein protektiver Einfluss der NTPDase auf das elektrophysiologische kardiale Infarktgeschehen durch Interferenz mit der Freisetzung von Neurotransmittern postuliert [Marcus et al., 2005]. Zum weiteren Studium der Effekte der vaskulären NTPDase *in vivo* wurden transgene Mäuse generiert, die humanes CD39 exprimieren [Dwyer et al., 2004].

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Ausgehend von den formulierten Hypothesen und Fragestellungen (siehe 1.5) lassen sich die Bedeutung der vaskulären NTPDase 1/CD39 für den hepatischen und intestinalen Ischämie-Reperfusionsschaden sowie die Implikationen für andere Organe und vergleichbare pathophysiologische Zustände wie folgt zusammenfassen:

1. Der quantitative Anteil der NTPDase 1 an der globalen Nukleotidase-Aktivität der Organe lässt keinen Rückschluss auf deren Bedeutung für die Ischämietoleranz des Organsystems zu, da sich der Ischämie-Reperfusionsschaden initial am Endothel des Gefäßbettes manifestiert.

2. Nach Freigabe des Blutstromes lässt sich ein unmittelbarer Verlust der vaskulären NTPDase-Aktivität nachweisen, der sich in Abhängigkeit vom Ausmaß der Schädigung in der Ischämiephase und den fortgesetzten Insulten in der Reperfusionsphase innerhalb von einer Stunde rekonstituiert oder erst in Tagen eine Regeneration erfährt.

3. Die Substitution der intravasalen NTPDase-Aktivität unmittelbar vor Freigabe des Blutstromes erhöht die Ischämietoleranz der Leber und des Intestinums signifikant.

4. Im postischämen Jejunum lässt sich nach Supplementation der NTPDase eine Verminderung der frühen Phase der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen in postkapillären Venolen sowie eine signifikant verminderte Gefäßpermeabilität nachweisen.

5. Die protektiven Effekte der vaskulären NTPDase lassen sich nur teilweise durch die Applikation von Adenosin/Amrinon in der Reperfusionsphase reproduzieren.

6. Die postischäme Substitution der intravasalen NTPDase hat sowohl das Potential, den prothrombotischen und proinflammatorischen Stimulus der Nukleotide ATP und ADP zu eliminieren als auch die antiaggregatorisch und antiinflammatorisch wirksame Generation des endogenen Adenosins zu fördern.

7. Vergleichbare Effekte der pharmakologischen Applikation löslicher NTPDasen lassen sich sowohl für die Transplantation aller soliden Organe als auch für arterielle Verschlusskrankheiten postulieren. Ein potentieller Nutzen kann darüber hinaus für chronisch entzündliche Prozesse angenommen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Nukleotide Adenosintriphosphat (ATP) und –diphosphat (ADP) sowie das Adenosin selbst wurden in der Mitte des 20. Jahrhunderts als interzelluläre Signalmoleküle identifiziert, nachdem ihre Bedeutung für den Stoffwechsel der Zelle bereits zu Beginn des Jahrhunderts evident wurde. Als Quelle der extrazellulären Nukleotide wurden sowohl aktive (Exozytose und Vesikeltransport) als auch passive (Zelllyse und Membranpermeabilität) zelluläre Mechanismen beschrieben. Mit der Sequenzierung der verschiedenen Rezeptoren in den neunziger Jahren begann die Zuordnung der Nukleotide und des Nukleosids zu den verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.

Der Katabolismus der extrazellulären Nukleotide erfolgt im Wesentlichen durch die plasmamembranständigen Ekto-Nukleotidasen, von denen relevante funktionelle Daten derzeit lediglich für die Familie der Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDase) und die 5'-Nukleotidase (5'-NT) vorliegen. Die NTPDase 1/CD39 wird auf Endothelzellen exprimiert, hydrolisiert effektiv ATP und ADP zu Adenosinmonophosphat (AMP) und wurde als die dominante vaskuläre NTPDase identifiziert. Die 5'-NT zeigt eine ubiquitäre Verbreitung, findet sich auch in löslicher Form und katalysiert die Hydrolyse des AMP zu Adenosin. Die frei zirkulierenden Nukleoside werden dann rasch über zellmembranständige Transportproteine in den Intrazellularraum aufgenommen.

Als Folge von Ischämie und Reperfusion konnte in verschiedenen Organsystemen eine Abnahme der Aktivität der NTPDase 1 nachgewiesen werden. In der Konsequenz wurde eine lokal erhöhte ADP-Konzentration postuliert, die über die Stimulation der Thrombozytenaggregation den Ischämie-Reperfusionsschaden manifestiert. Die Substitution einer wasserlöslichen NTPDase ist geeignet, diesen Prozess zu unterbrechen. Die Elimination der Nukleotide ATP und ADP reduziert den thrombogenen Reiz und minimiert darüber hinaus die proinflammatorische Stimulation der Endothelzellen. Weiterhin ist das Produkt der Hydrolyse, AMP, das Substrat der 5'-NT und somit eine endogene Adenosinquelle. Dem Adenosin wurde eine bedeutende Rolle bei der Induktion einer Ischämietoleranz zu geschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es, den quantitativen Anteil der NTPDase 1 an der globalen Nukleotidase-Aktivität durch Vergleich von murinen Wildtyp- und cd39-defizienten Organen sowie die Dynamik des postischämen Aktivitätsverlustes in Transplantations- und Ischämie-Reperfusionsmodellen zu bestimmen. Die qualitative Bedeutung der NTPDase 1 für den hepatischen und intestinalen Ischämie-Reperfusionsschaden wird anhand der Überlebensraten in Wildtyp- und cd39-defizienten Mäusen dargestellt. Verschiedene Strategien zur Kompensation des cd39-Mangels werden in den Überlebensstudien überprüft. Die Analyse der frühen Phase der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen nach intestinaler Ischämie erfolgt mittels intravitaler Videomikroskopie in Wildtyp-Mäusen, mit oder ohne Substitution der intravasalen NTPDase-Aktivität. Als Parameter der Endothelzell-Aktivierung wird die Dynamik der postischämen intestinalen Gefäßpermeabilität in *cd39*-null und Wildtyp-Mäusen bestimmt und die Farbstoffakkumulation im Gewebe nach Substitution der intravasalen NTPDase-Aktivität oder Adenosin/Amrinon quantifiziert.

Die globale Nukleotidase-Aktivität der verschiedenen Organe ebenso wie der Anteil der NTPDase 1 an der Gesamtaktivität weist eine erhebliche Variabilität auf. Mehr als die Hälfte der Nukleotidase-Aktivität der Leber entfällt auf die alkalische Phosphatase, während die NTPDase 1 quantitativ keine Relevanz hat. Im Jejunum hingegen entfällt die Hälfte der Nukleotidase-Aktivität auf die NTPDase 1. Unabhängig von diesen Befunden stellt die NTPDase 1 einen bedeutenden Faktor für die Ischämietoleranz beider Organsysteme dar. Der cd39-Mangel der Versuchstiere kann durch die Substitution mit löslicher NTPDase oder Adenosin/Amrinon teilweise kompensiert werden. In der frühen Reperfusionsphase des Intestinums zeigt sich in den vaskulären Strukturen der Wildtyp-Mäuse ein signifikanter Abfall der NTPDase-Aktivität, die innerhalb von 60 Minuten eine vollständige Rekonstitution erfährt. In dem Transplantationsmodell (heterotope, xenogene Herztransplantation) mit einem zusätzlichen Konservierungsschaden und fortgesetzten immunologischen Insulten zeigt sich eine erheblich verzögerte Rekonstitution der NTPDase-Aktivität. In dem Modell der intestinalen Ischämie in Wildtyp-Mäusen führt die Substitution mit der löslichen NTPDase in der Reperfusionsphase zu einer signifikanten Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschaden, die Applikation von Adenosin/Amrinon erhöht die

Überlebensrate hingegen nicht. Die vermehrte Adhäsion der Thrombozyten an der Gefäßwand der postkapillären Venolen in der frühen Reperfusionsphase wird durch die NTPDase-Substitution auf die Werte der scheinoperierten Kontrollen reduziert. In den Untersuchungen zur Gefäßpermeabilität des Jejunums zeigt sich eine signifikant erhöhte Empfindlichkeit der *cd39*-null Mäuse für intestinale Traumen (Ischämie-Reperfusion und Scheinoperation) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. In beiden untersuchten Genotypen kann die postischäme Steigerung der Gefäßpermeabilität durch Substitution der intravasalen NTPDase oder von Adenosin/Amrinon verhindert werden.

In der Schlussfolgerung kommt der NTPDase 1 eine zentrale Bedeutung für die Ischämietoleranz der Leber und des Intestinums der Maus zu. Der Verlust der NTPDase-Aktivität in der Frühphase der Reperfusion kann durch die Substitution der intravasalen NTPDase kompensiert werden, die den intestinalen Ischämie-Reperfusionsschaden signifikant vermindert. Die duale Wirkung der NTPDase reduziert die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen und verringert die vaskuläre Permeabilität. Vergleichbare Effekte können für die Transplantation aller soliden Organe, bei arteriellen Verschlusskrankheiten sowie bei chronischen entzündlichen Prozessen postuliert werden.

7 DANKSAGUNG

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. P. Neuhaus, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, danke ich für die immerwährende Förderung meiner klinischen, chirurgischen und wissenschaftlichen Ausbildung. Ohne diesen Rückhalt hätte diese Arbeit nicht entstehen können. Dankbar habe ich darüber hinaus eine besondere Unterstützung meiner berufspolitischen Aktivitäten erfahren. Professor Neuhaus prägt mein Bild der modernen akademischen Chirurgie.

Herrn Prof. Dr. S. C. Robson, Director of Liver Research, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA, danke ich für die enge Begleitung und fortwährende Unterstützung meiner Forschungsprojekte. Meine Zeit als Postdoc in seinem Labor produzierte die Grundlagen dieser Monographie und die stets inspirierenden Diskussionen und Anregungen haben wesentlichen Anteil an der Realisierung. Der Forschungsaufenthalt in Boston wurde durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Gu 490/1-2) finanziert.

Besondere Erwähnung bedürfen außerdem die folgenden Wissenschaftler, die mir unermüdlich und in enger Freundschaft mit ihrem Sachverstand die notwendigen Einblicke vermittelten: Jean Sévigny, Quebec City, Kanada (Molekularbiologie und Biochemie der NTPDasen), Elzbieta „Kita“ Kaczmarek, Boston (purinerge Rezeptoren), Masato Imai, Boston (mikrochirurgische Modelle), Christiane Ferran, Boston (A20), Jonathan „Jonny“ Kruskal, Boston (intravitale Videomikroskopie).

Weiterhin gilt mein besonderer Dank den Kolleginnen und Kollegen aus dem Vascular Biology Research Center, Boston, und assoziierten Laboren, die mir stets freundschaftlich zugewandt waren und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Stellvertretend für das ganze Team seien hier Eva Csizmadia, Boston, Imrana Qawi, Boston, Katarzyna Koziak, Warschau, Polen, Soizic Daniel, Boston, Maria Arvelo, Boston, Shane Grey, Sydney, Australien, Eduardo Rocha, Rio de Janeiro, Brasilien und Miguel Soares, Lissabon, Portugal genannt.

Der Weg zur Habilitation führte über eine solide chirurgische Ausbildung, die ich dankenswerter Weise erfahren durfte. Stellvertretend für die vielen beteiligten Personen seien hier Prof. Dr. med. H. Weidemann, Berlin und Prof. Dr. med. W. O. Bechstein, Frankfurt/Main genannt.

Sowohl meine chirurgische Tätigkeit als auch die wissenschaftlichen Aktivitäten konnten nur in dem kollegialen Umfeld der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie gedeihen, das mir jederzeit Unterstützung im klinischen Alltag war und gleichzeitig die notwendigen Freiräume ermöglichte. Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik. Frau PD Dr. med. N. Nüssler und Herrn Dr. med. R. Lohmann gebührt mein besonderer Dank, denn sie beeinflussten maßgeblich meine Entscheidung für die Chirurgie.

Bei dem „kleinen Kreis“ der Ärzteinitiative der Charité und allen Unterstützern möchte ich mich für die engagierte gemeinsame Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Wir prägten signifikant die neuen bundesweiten Tarifverträge für Ärzte und werden weiterhin konstruktiv und kritisch die Bedingungen für Klinik, Wissenschaft und Lehre an der Charité begleiten. Die Ärzteinitiative ist eine willkommene Herausforderung und Erweiterung meiner beruflichen Tätigkeiten.

Der allergrößte Dank gebührt jedoch meiner Frau, Ina Pöche-Guckelberger und meiner Tochter, Philine, die die Höhen und Tiefen meiner klinischen, wissenschaftlichen und politischen Arbeit aufmerksam begleiteten. Mit Humor quittierten sie gelegentlichen übermäßigen Eifer, mit Freude zelebrierten sie zwischenzeitliche Erfolge und mit Ansporn trieben sie mich aus der Talsohle. Ohne ihre Unterstützung hätte diese Monographie nicht vollendet werden können.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S, Kim HO, von Lubitz DK, Jacobson KA, Cattabeni F: G protein-dependent activation of phospholipase c by adenosine a3 receptors in rat brain. Mol Pharmacol 1995; 48: 1038-1045

Arvelo MB, Cooper JT, Longo C, Daniel S, Grey ST, Mahiou J, Czismadia E, Abu-Jawdeh G, Ferran C: A20 protects mice from d-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis. Hepatology 2002; 35: 535-543

Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K, Robson SC: Ecto-nucleotidases of the cd39/ntpdase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. Blood Cells Mol Dis 2006; 36: 217-222

Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry 1968; 7: 4030-4034

Aydemir-Koksoy A, Koksoy C, Kuzu MA, Demirpence E, Cinel I, Kesenci M, Yavuzer S: Intestinal ischemia-reperfusion leads to platelet dysfunction. Thromb Res 1999; 94: 395-400

Bach FH, Robson SC, Ferran C, Winkler H, Millan MT, Stuhlmeier KM, Vanhove B, Blakely ML, van der Werf WJ, Hofer E, et al.: Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. Immunol Rev 1994; 141: 5-30

Bach FH, Turman MA, Vercellotti GM, Platt JL, Dalmasso AP: Accommodation: A working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. Transplant Proc 1991; 23: 205-207

Banfi C, Ferrario S, De Vincenti O, Ceruti S, Fumagalli M, Mazzola A, N DA, Volonte C, Fratto P, Vitali E, Burnstock G, Beltrami E, Parolari A, Polvani G, Biglioli P, Tremoli E, Abbracchio MP: P2 receptors in human heart: Upregulation of p2x6 in patients

undergoing heart transplantation, interaction with tnfalpha and potential role in myocardial cell death. J Mol Cell Cardiol 2005; 39: 929-939

Barone GW, Farley PC, Conerly JM, Flanagan TL, Kron IL: Morphological and functional techniques for assessing endothelial integrity: The use of evans blue dye, silver stains, and endothelial derived relaxing factor. J Card Surg 1989; 4: 140-148

Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM: A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. Anal Biochem 1988; 171: 266-270

Beaudoin AR, Grondin G, Enjyoji K, Robson SC, Sevigny J, Fische B, Grendon F-P (1999) The physiological role of ntpdases (atp diphosphohydrolases) in mammals. In: Vanduffel L, Lemmens R (eds) Ecto-atpases and related ectonucleotidases. Shaker Publishing, Maastricht, pp 125-135

Ben-Ari Z, Pappo O, Sulkes J, Cheporko Y, Vidne BA, Hochhauser E: Effect of adenosine a2a receptor agonist (cgs) on ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver. Apoptosis 2005; 10: 955-962

Benrezzak O, Grondin G, Sevigny J, Gendron FP, Rousseau E, D'Orleans-Juste P, Beaudoin AR: Identification and immunolocalization of two isoforms of atp-diphosphohydrolase (atpdase) in the pig immune system. Arch Biochem Biophys 1999; 370: 314-322

Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sevigny J: Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. Biochemistry 2004; 43: 5511-5519

Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B: Overview of the p2 receptors. Semin Thromb Hemost 2005; 31: 139-149

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254

Brake AJ, Julius D: Signaling by extracellular nucleotides. Annu Rev Cell Dev Biol 1996; 12: 519-541

Braun N, Sevigny J, Robson SC, Hammer K, Hanani M, Zimmermann H: Association of the ecto-atpase ntpdase2 with glial cells of the peripheral nervous system. Glia 2004; 45: 124-132

Bucheimer RE, Linden J: Purinergic regulation of epithelial transport. J Physiol 2004; 555: 311-321

Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L (eds) Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach. Raven Press, New York, pp 107-118

Burnstock G: Purinergic signalling. Br J Pharmacol 2006; 147 Suppl 1: S172-181

Candinas D, Koyamada N, Miyatake T, Siegel J, Hancock WW, Bach FH, Robson SC: Loss of rat glomerular atp diphosphohydrolase activity during reperfusion injury is associated with oxidative stress reactions. Thromb Haemost 1996; 76: 807-812

Carini R, Albano E: Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. Gastroenterology 2003; 125: 1480-1491

Cattaneo M, Canciani MT, Lecchi A, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mannucci PM, Mustard JF: Released adenosine diphosphate stabilizes thrombin-induced human platelet aggregates. Blood 1990; 75: 1081-1086

Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB: Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: A review. Acta Cir Bras 2005; 20: 336-343

Chen YF, Li PL, Zou AP: Oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001; 281: R1808-1816

Cooper D, Chitman KD, Williams MC, Granger DN: Time-dependent platelet-vessel wall

interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003; 284: G1027-1033

Cooper D, Russell J, Chitman KD, Williams MC, Wolf RE, Granger DN: Leukocyte dependence of platelet adhesion in postcapillary venules. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 286: H1895-1900

Cotran RS, Pober JS: Effects of cytokines on vascular endothelium: Their role in vascular and immune injury. Kidney Int 1989; 35: 969-975

Cotran RS, Pober JS: Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. J Am Soc Nephrol 1990; 1: 225-235

Coutinho-Silva R, Parsons M, Robson T, Lincoln J, Burnstock G: P2x and p2y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. Mol Cell Endocrinol 2003; 204: 141-154

Cywes R, Mullen JB, Stratis MA, Greig PD, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM: Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. Transplantation 1993; 56: 316-323

Daly JW, Padgett WL: Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their n6-cycloalkyl derivatives at a1- and a2-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase. Biochem Pharmacol 1992; 43: 1089-1093

Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ: Ischemic preconditioning prevents postischemic p-selectin expression in the rat small intestine. Am J Physiol 1999; 277: H2476-2481

Day YJ, Marshall MA, Huang L, McDuffie MJ, Okusa MD, Linden J: Protection from ischemic liver injury by activation of a2a adenosine receptors during reperfusion: Inhibition of chemokine induction. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 286: G285-293

Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, Lopez JA, Afshar-Kharghan V: Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. J Exp Med 2005; 201: 871-879

Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, Hynes RO, Wagner DD: A mouse model of severe von willebrand disease: Defects in hemostasis and thrombosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 9524-9529

Deussen A, Bading B, Kelm M, Schrader J: Formation and salvage of adenosine by macrovascular endothelial cells. Am J Physiol 1993; 264: H692-700

Dranoff JA, Kruglov EA, Robson SC, Braun N, Zimmermann H, Sevigny J: The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase ntpdase2/cd39l1 is expressed in a novel functional compartment within the liver. Hepatology 2002; 36: 1135-1144

Dranoff JA, Kruglov EA, Toure J, Braun N, Zimmermann H, Jain D, Knowles AF, Sevigny J: Ectonucleotidase ntpdase2 is selectively down-regulated in biliary cirrhosis. J Investig Med 2004a; 52: 475-482

Dranoff JA, Masyuk AI, Kruglov EA, LaRusso NF, Nathanson MH: Polarized expression and function of p2y atp receptors in rat bile duct epithelia. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 281: G1059-1067

Dranoff JA, Ogawa M, Kruglov EA, Gaca MD, Sevigny J, Robson SC, Wells RG: Expression of p2y nucleotide receptors and ectonucleotidases in quiescent and activated rat hepatic stellate cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004b; 287: G417-424

Drury AN, Szent-Györgyi A: The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. J Physiol 1929; 68: 213-237

Dunn LC (1991) A short history of genetics: The development of some of the main lines of thought: 1864-1939. Iowa State University Press, Ames

Duval M, Beaudoin AR, Bkaily G, Gendron FP, P DO-J: Characterization of the ntpdase activities in the mesentery pre- and post-capillary circuits of the guinea pig. Can J

Physiol Pharmacol 2003; 81: 212-219

Dwyer KM, Robson SC, Nandurkar HH, Campbell DJ, Gock H, Murray-Segal LJ, Fisicaro N, Mysore TB, Kaczmarek E, Cowan PJ, d'Apice AJ: Thromboregulatory manifestations in human cd39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. J Clin Invest 2004; 113: 1440-1446

Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC, Colgan SP: Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: Role of ectonucleotidases and adenosine a2b receptors. J Exp Med 2003; 198: 783-796

Enjyoji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS, 2nd, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD: Targeted disruption of cd39/atp diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. Nat Med 1999; 5: 1010-1017

Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Epstein CJ, Laroux S, Granger DN: Modulation of p-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. Am J Physiol 1997; 273: G1326-1332

Erlinge D, Hou M, Webb TE, Barnard EA, Moller S: Phenotype changes of the vascular smooth muscle cell regulate p2 receptor expression as measured by quantitative rt-pcr. Biochem Biophys Res Commun 1998; 248: 864-870

Fernandez-Alvarez J, Hillaire-Buys D, Loubatieres-Mariani MM, Gomis R, Petit P: P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. Pancreas 2001; 22: 69-71

Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J: International union of pharmacology. Xxv. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol Rev 2001; 53: 527-552

Fry DL, Mahley RW, Weisgraber KH, Oh SY: Simultaneous accumulation of evans blue dye

and albumin in the canine aortic wall. Am J Physiol 1977; 233: H66-79

Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owren PA: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. Nature 1961; 192: 531-532

Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W: Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76: 5939-5943

Gayle RB, 3rd, Maliszewski CR, Gimpel SD, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards C, Brasel K, Price V, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Broekman MJ, Marcus AJ: Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-adpase/cd39. J Clin Invest 1998; 101: 1851-1859

Giaroni C, Knight GE, Ruan HZ, Glass R, Bardini M, Lecchini S, Frigo G, Burnstock G: P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. Neuropharmacology 2002; 43: 1313-1323

Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC: Cd39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. Mol Med 2000; 6: 591-603

Guckelberger O, Sun XF, Sevigny J, Imai M, Kaczmarek E, Enjyoji K, Kruskal JB, Robson SC: Beneficial effects of cd39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. Thromb Haemost 2004; 91: 576-586

Haller CA, Cui W, Wen J, Robson SC, Chaikof EL: Reconstitution of cd39 in liposomes amplifies nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity and restores thromboregulatory properties. J Vasc Surg 2006; 43: 816-823

Harada N, Okajima K, Murakami K, Usune S, Sato C, Ohshima K, Katsuragi T: Adenosine and selective a(2a) receptor agonists reduce ischemia/reperfusion injury of rat liver mainly by inhibiting leukocyte activation. J Pharmacol Exp Ther 2000; 294: 1034-1042

Holton P: The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. J Physiol 1959; 145: 494-504

Hou M, Moller S, Edvinsson L, Erlinge D: Cytokines induce upregulation of vascular p2y(2) receptors and increased mitogenic responses to utp and atp. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2064-2069

Hunsucker SA, Mitchell BS, Spychala J: The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. Pharmacol Ther 2005; 107: 1-30

Imai M, Goepfert C, Kaczmarek E, Robson SC: Cd39 modulates il-1 release from activated endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2000a; 270: 272-278

Imai M, Guckelberger O, Kaczmarek E, Robson SC: Over-expression of cd39/atp diphosphohydrolase exacerbates lipopolysaccharide / galactosamine induced hepatic failure [abstract]. Hepatology 1999a; 30: 378A

Imai M, Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Goepfert C, Guckelberger O, Csizmadia E, Schulte Am Esch J, 2nd, Robson SC: Suppression of atp diphosphohydrolase/cd39 in human vascular endothelial cells. Biochemistry 1999b; 38: 13473-13479

Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Enjyoji K, Smith RN, Lin Y, Csizmadia E, Sevigny J, Rosenberg RD, Bach FH, Robson SC: Modulation of nucleoside [correction of nucleotide] triphosphate diphosphohydrolase-1 (ntpdase-1)cd39 in xenograft rejection. Mol Med 1999c; 5: 743-752

Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Kaczmarek E, Csizmadia E, Bach FH, Robson SC: Recombinant adenoviral mediated cd39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. Transplantation 2000b; 70: 864-870

Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S: Vascular endothelial growth factor (vegf) and its effect on angiogenesis. Med Sci Monit 2000; 6: 1047-1052

Kaczmarek E, Erb L, Koziak K, Jarzyna R, Wink MR, Guckelberger O, Blusztajn JK, Trinkaus-Randall V, Weisman GA, Robson SC: Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: Involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. Thromb Haemost 2005; 93: 735-742

Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC: Identification and characterization of cd39/vascular atp diphosphohydrolase. J Biol Chem 1996; 271: 33116-33122

Kanko M, Maral H, Akbas MH, Ozden M, Bulbul S, Omay O, Yavuz S, Berki KT: Protective effects of clopidogrel on oxidant damage in a rat model of acute ischemia. Tohoku J Exp Med 2005; 205: 133-139

Kansas GS, Wood GS, Tedder TF: Expression, distribution, and biochemistry of human cd39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. J Immunol 1991; 146: 2235-2244

Kauffman RF, Schenck KW, Utterback BG, Crowe VG, Cohen ML: In vitro vascular relaxation by new inotropic agents: Relationship to phosphodiesterase inhibition and cyclic nucleotides. J Pharmacol Exp Ther 1987; 242: 864-872

Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP: International union of pharmacology. Xxiv. Current status of the nomenclature and properties of p2x receptors and their subunits. Pharmacol Rev 2001; 53: 107-118

Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F: Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: A systematic analysis. Microvasc Res 2003; 65: 71-77

Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF (1986) Synergism of agonists. In: Holmsen H (ed) Platelet responses and metabolism., vol Vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 193-207

Kirton CM, Nash GB: Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface. J Lab Clin Med 2000; 136: 303-313

Kittel A, Garrido M, Varga G: Localization of ntpdase1/cd39 in normal and transformed human pancreas. J Histochem Cytochem 2002; 50: 549-556

Kittel A, Kiss AL, Mullner N, Matko I, Sperlagh B: Expression of ntpdase1 and caveolins in human cardiovascular disease. Histochem Cell Biol 2005; 124: 51-59

Kittel A, Pelletier J, Bigonnesse F, Guckelberger O, Kordas K, Braun N, Robson SC, Sevigny J: Localization of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (ntpdase1) and ntpdase2 in pancreas and salivary gland. J Histochem Cytochem 2004; 52: 861-871

Knowles AF, Li C: Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (e-ntpdase 8) and its soluble extracellular domain. Biochemistry 2006; 45: 7323-7333

Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR: Protection of the liver by ischemic preconditioning: A review of mechanisms and clinical applications. Dig Surg 2003; 20: 383-396

Koyamada N, Miyatake T, Candinas D, Hechenleitner P, Siegel J, Hancock WW, Bach FH, Robson SC: Apyrase administration prolongs discordant xenograft survival. Transplantation 1996; 62: 1739-1743

LeBel D, Poirier GG, Phaneuf S, St-Jean P, Laliberte JF, Beaudoin AR: Characterization and purification of a calcium-sensitive atp diphosphohydrolase from pig pancreas. J Biol Chem 1980; 255: 1227-1233

Leclerc MC, Grondin G, Gendron FP, Sevigny J, Beaudoin AR: Identification, characterization, and immunolocalization of a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase in pig liver. Arch Biochem Biophys 2000; 377: 372-378

Lefer AM, Lefer DJ: Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1993; 33: 71-90

Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ: Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. Hepatology 2000; 32: 169-173

Li X, Zhou T, Zhi X, Zhao F, Yin L, Zhou P: Effect of hypoxia/reoxygenation on cd73 (ecto-5'-

nucleotidase) in mouse microvessel endothelial cell lines. Microvasc Res 2006;

Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR: Hypothesis: Is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? Kidney Int 1999; 55: 2157-2168

Luthje J: Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. Klin Wochenschr 1989; 67: 317-327

Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM: Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Dig Dis Sci 2004; 49: 1359-1377

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ, Levi R: Role of cd39 (ntpdase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. Semin Thromb Hemost 2005; 31: 234-246

Martin-Villa JM, Ferre-Lopez S, Lopez-Suarez JC, Corell A, Perez-Blas M, Arnaiz-Villena A: Cell surface phenotype and ultramicroscopic analysis of purified human enterocytes: A possible antigen-presenting cell in the intestine. Tissue Antigens 1997; 50: 586-592

Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K: Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: The role of p-selectin. Blood 1998; 92: 507-515

Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F: Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. Blood 1999; 94: 3829-3838

Mause SF, von Hundelshausen P, Zernecke A, Koenen RR, Weber C: Platelet microparticles: A transcellular delivery system for rantes promoting monocyte recruitment on endothelium. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 1512-1518

Mehta D, Malik AB: Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. Physiol Rev 2006; 86: 279-367

Miescher F: Ueber die chemische zusammensetzung der eiterzellen. Med-Chem Untersuch 1871; 4: 441-460

Milazzo VJ, Ferrante RJ, Sabido F, Silva MB, Jr., Hobson RW, 2nd, Duran WN: Time course of leukocyte adhesion to endothelium in ischemia-reperfusion. J Surg Res 1996; 61: 139-142

Mizutani A, Murakami K, Okajima K, Kira S, Mizutani S, Kudo K, Takatani J, Goto K, Hattori S, Noguchi T: Olprinone reduces ischemia/reperfusion-induced acute renal injury in rats through enhancement of camp. Shock 2005; 24: 281-287

Moore KL, Esmon CT, Esmon NL: Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. Blood 1989; 73: 159-165

Motte S, Communi D, Pirotton S, Boeynaems JM: Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular atp: The example of vascular endothelial cells. Int J Biochem Cell Biol 1995; 27: 1-7

Mullane KM, Kraemer R, Smith B: Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. J Pharmacol Methods 1985; 14: 157-167

Nguyen TD, Meichle S, Kim US, Wong T, Moody MW: P2y(11), a purinergic receptor acting via camp, mediates secretion by pancreatic duct epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 280: G795-804

Noji T, Karasawa A, Kusaka H: Adenosine uptake inhibitors. Eur J Pharmacol 2004; 495: 1-16

Odashima M, Otaka M, Jin M, Komatsu K, Wada I, Matsuhashi T, Horikawa Y, Hatakeyama N, Oyake J, Ohba R, Linden J, Watanabe S: Selective a2a adenosine agonist atl-146e attenuates acute lethal liver injury in mice. J Gastroenterol 2005; 40: 526-529

Ono K, Lindsey ES: Improved technique of heart transplantation in rats. J Thorac Cardiovasc

Surg 1969; 57: 225-229

Packham MA, Mustard JF: Platelet aggregation and adenosine diphosphate/adenosine triphosphate receptors: A historical perspective. Semin Thromb Hemost 2005; 31: 129-138

Palmer TM, Stiles GL: Identification of an a2a adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization. Biochemistry 1997; 36: 832-838

Peakman MC, Hill SJ: Adenosine a2b-receptor-mediated cyclic amp accumulation in primary rat astrocytes. Br J Pharmacol 1994; 111: 191-198

Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES, Jr., Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR: Elucidation of the thromboregulatory role of cd39/ectoapyrase in the ischemic brain. J Clin Invest 2002; 109: 1031-1040

Pinsky DJ, Yan SF, Lawson C, Naka Y, Chen JX, Connolly ES, Jr., Stern DM: Hypoxia and modification of the endothelium: Implications for regulation of vascular homeostatic properties. Semin Cell Biol 1995; 6: 283-294

Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, Oegema TR, Jr., Bach FH, Dalmasso AP: Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection. J Exp Med 1990; 171: 1363-1368

Pober JS, Cotran RS: Cytokines and endothelial cell biology. Physiol Rev 1990; 70: 427-451

Riksen NP, Smits P, Rongen GA: Ischaemic preconditioning: From molecular characterisation to clinical application--part i. Neth J Med 2004a; 62: 353-363

Riksen NP, Smits P, Rongen GA: Ischaemic preconditioning: From molecular characterisation to clinical application--part ii. Neth J Med 2004b; 62: 409-423

Robson SC, Kaczmarek E, Siegel JB, Candinas D, Koziak K, Millan M, Hancock WW, Bach

FH: Loss of atp diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. J Exp Med 1997; 185: 153-163

Robson SC, Schulte am Esch J, 2nd, Bach FH: Factors in xenograft rejection. Ann N Y Acad Sci 1999; 875: 261-276

Robson SC, Sevigny J, Imai M, Guckelberger O, Enjyoji K: Thromboregulatory potential of endothelial cd39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase: Modulation of purinergic signalling in platelets. Emerging Therapeutic Targets 2000; 4: 155-171

Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K: Ectonucleotidases of cd39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. Semin Thromb Hemost 2005; 31: 217-233

Salter JW, Krieglstein CF, Issekutz AC, Granger DN: Platelets modulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in the mesenteric circulation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 281: G1432-1439

Schweickhardt C, Sabolic I, Brown D, Burckhardt G: Ecto-adenosinetriphosphatase in rat small intestinal brush-border membranes. Am J Physiol 1995; 268: G663-672

Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT: Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg 2001; 181: 160-166

Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RC, Mathie RT: Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. BMC Gastroenterol 2002; 2: 22

Sevigny J, Grondin G, Gendron FP, Roy J, Beaudoin AR: Demonstration and immunolocalization of atp diphosphohydrolase in the pig digestive system. Am J Physiol 1998; 275: G473-482

Sevigny J, Levesque FP, Grondin G, Beaudoin AR: Purification of the blood vessel atp diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques.

Biochim Biophys Acta 1997; 1334: 73-88

Sevigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC: Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (ntpdase1) and ntpdase2 have implications for thromboregulation. Blood 2002; 99: 2801-2809

Soares MP, Lin Y, Sato K, Stuhlmeier KM, Bach FH: Accommodation. Immunol Today 1999; 20: 434-437

Stone TW: Receptors for adenosine and adenine nucleotides. Gen Pharmacol 1991; 22: 25-31

Sullivan GW: Adenosine a2a receptor agonists as anti-inflammatory agents. Curr Opin Investig Drugs 2003; 4: 1313-1319

Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP: Ecto-5'-nucleotidase (cd73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. J Clin Invest 2002; 110: 993-1002

Tanaka N, Kawasaki K, Nejime N, Kubota Y, Nakamura K, Kunitomo M, Takahashi K, Hashimoto M, Shinozuka K: P2y receptor-mediated ca(2+) signaling increases human vascular endothelial cell permeability. J Pharmacol Sci 2004; 95: 174-180

Teoh NC, Farrell GC: Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18: 891-902

Thiagarajan RR, Winn RK, Harlan JM: The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. Thromb Haemost 1997; 78: 310-314

Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP: Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (cd73) in vascular leakage during hypoxia. J Exp Med 2004; 200: 1395-1405

Thomson LF, Ruedi JM, Glass A, Moldenhauer G, Moller P, Low MG, Klemens MR, Massaia M, Lucas AH: Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (cd73). Tissue Antigens 1990; 35: 9-19

Thorn JA, Jarvis SM: Adenosine transporters. Gen Pharmacol 1996; 27: 613-620

Trumel C, Payrastre B, Plantavid M, Hechler B, Viala C, Presek P, Martinson EA, Cazenave JP, Chap H, Gachet C: A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the par1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. Blood 1999; 94: 4156-4165

Unal S, Demirkan F, Arslan E, Cin I, Cinel L, Eskandari G, Cinel I: Comparison of ischemic and chemical preconditioning in jejunal flaps in the rat. Plast Reconstr Surg 2003; 112: 1024-1031

Van Belle H: Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues. Biochim Biophys Acta 1972; 289: 158-168

Vandendries ER, Furie BC, Furie B: Role of p-selectin and psgl-1 in coagulation and thrombosis. Thromb Haemost 2004; 92: 459-466

Vekaria RM, Shirley DG, Sevigny J, Unwin RJ: Immunolocalization of ectonucleotidases along the rat nephron. Am J Physiol Renal Physiol 2006; 290: F550-560

Vischer UM, Wollheim CB: Purine nucleotides induce regulated secretion of von willebrand factor: Involvement of cytosolic ca2+ and cyclic adenosine monophosphate-dependent signaling in endothelial exocytosis. Blood 1998; 91: 118-127

Wang J, Whitt SP, Rubin LJ, Huxley VH: Differential coronary microvascular exchange responses to adenosine: Roles of receptor and microvessel subtypes. Microcirculation 2005; 12: 313-326

Ware JA, Smith M, Salzman EW: Synergism of platelet-aggregating agents. Role of elevation

of cytoplasmic calcium. J Clin Invest 1987; 80: 267-271

Wu MH: Endothelial focal adhesions and barrier function. J Physiol 2005; 569: 359-366

Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K: Animal models for the study of adenosine receptor function. J Cell Physiol 2005; 202: 9-20

Yadav SS, Gao W, Harland RC, Clavien PA: A new and simple technique of total hepatic ischemia in the mouse. Transplantation 1998; 65: 1433-1436

Yeung G, Mulero JJ, McGowan DW, Bajwa SS, Ford JE: Cd39l2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. Biochemistry 2000; 39: 12916-12923

Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O: Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: The a3 adenosine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 7432-7436

Zimmermann H: Nucleotides and cd39: Principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. Nat Med 1999; 5: 987-988

Zimmermann H: Extracellular metabolism of atp and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000; 362: 299-309

Zimmermann H: Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. Drug Development Research 2001; 52: 44-56

9 ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 01. März 2007 Dr. med. Olaf Guckelberger